

Helen Caroline Raksa

Contribuciones científicas a la
influencia que tienen los factores
genéticos en la susceptibilidad a
las EET en pequeños rumiantes

Departamento
Patología Animal

Director/es
Badiola Diez, Juan José
Acín Tresaco, Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS A LA
INFLUENCIA QUE TIENEN LOS FACTORES
GENÉTICOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS EET
EN PEQUEÑOS RUMIANTES

Autor

Helen Caroline Raksa

Director/es

Badiola Diez, Juan José
Acín Tresaco, Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2018



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Contribuciones científicas a la influencia que
tienen los factores genéticos en la susceptibilidad
a las EET en pequeños rumiantes

Helen Caroline Raksa

Director/es

Cristina Acín Tresaco
Juan José Badiola Díez

Facultad de Veterinaria
2018



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. CRISTINA ACÍN TRESACO y D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ, Profesora Ayudante Doctor y Catedrático del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que Dña. Helen Caroline Raksa ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulado “ **Contribuciones científicas a la influencia que tienen los factores genéticos en la susceptibilidad a las EET en pequeños rumiantes** ”, que se corresponde con el proyecto de tesis aprobado por la Comisión de Doctorado y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, Abril de 2018.

Fdo.: Cristina Acín Tresaco

Fdo.: Juan José Badiola Díez

El presente trabajo se ha realizado en el Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y en el Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza.

Para la elaboración del presente trabajo de tesis doctoral, la doctoranda ha disfrutado de una beca concedida por el Gobierno de Brasil, por el “Programa Ciências sem Fronteiras - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”, número 013772/2013-09.

Este trabajo ha sido posible realizarlo gracias a la financiación recibida a través del sexto y séptimo programa Marco de la Unión Europea que ha permitido la disponibilidad del material utilizado; al Ministerio de Economía y competitividad por la financiación de parte de las investigaciones llevadas a cabo; y a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen los dos Directores del trabajo. Asimismo, el trabajo ha contado con la financiación parcial de proyectos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y del Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón.



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. CRISTINA ACÍN TRESACO, Profesora Ayudante Doctor y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Catedrático de Universidad, ambos pertenecientes al Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que Dña. Helen Caroline Raksa, bajo nuestra dirección, presenta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulado “**Contribuciones científicas a la influencia que tienen los factores genéticos en la susceptibilidad a las EET en pequeños rumiantes**” para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con “Mención Internacional”. Cumpliendo la legislación vigente, este trabajo incluye dos informes de los siguientes expertos doctores pertenecientes a instituciones extranjeras:

Dr. Dolores Gavier-Widen, Associate Professor at the Swedish University of Agricultural Sciences, Deputy Head of Department of Pathology and Wildlife Diseases, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. Fecha y Universidad de expedición del título de doctor: 26/03/1992, Universidad de California.

Dr. Hicham Filali, IM2A (Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer), Bâtiment François Lhermitte, Hôpital de la Salpêtrière, 47/83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris. Fecha y Universidad de expedición del título de doctor: 30/07/2013, Universidad de Zaragoza.

Así mismo, avalamos la realización por parte de la doctoranda de una estancia en un centro de investigación extranjero por el periodo de tres meses: Estancia desde el 1 de abril al 30 de junio de 2017 (91 días) en el Roslin Institute, University of Edinburgh (UK), en la que la doctoranda trabajó en la investigación de aspectos genéticos en ciervos y cabras.

En Zaragoza, a 11 de abril de 2018.

Fdo.: Cristina Acín Tresaco

Fdo.: Juan José Badiola Díez

ABREVIATURAS

μl: Microlitro

g: gramo

μm: Micrometro

ml: mililitro

Aminoácidos

A: alanina

K: lisina

R: arginina

C: cisteína

L: leucina

S: serina

E: ácido glutámico

M: metionina

T: tirosina

F: fenilalanina

N: asparagina

V: valina

G: glicina

P: prolina

Y: tirosina

H: histidina

Q: glutamina

W: tripitófano

I: isoleucina

CDF: Células dendríticas foliculares

DAB: Diaminobencidina

DPI: Días post inoculación

ECJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EEB: Encefalopatía espongiiforme bovina

EEC: Enfermedad crónica caquetizante

EUE: Encefalopatía de ungulados exóticos

EEF: Encefalopatía espongiiforme felina

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EET: Encefalopatía espongiiforme transmisible

ETV: Encefalopatía transmisible del visón

IFF: Insomnio Fatal Familiar

GALT: Tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal

GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker

HE: Hematoxilina y eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

ID: Identificación

ITAS: Intra-astrocítico

ITMG: Intramicroglial
ITNR: Intraneuronal
LT β R-Ig: linfotoxina β
LN: Linfonodo
MPI: Meses post inoculación
DMNV: Núcleo motor dorsal del nervio vago
ORF: Open reading frame / marco de lectura abierto
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pK: Proteinasa K
PART GRUESO: Particulado grueso
PART FINO: Particulado fino
PMCA: Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas
PNER: Perineuronal
PRND: Gen que codifica la proteína doppel
PRNP: Gen que codifica la PrP celular
PrP: Proteína prion
PrP^C: Proteína prion celular
PrP^{Sc}: Proteína prion patológica
PVAC: Perivacuolar
PVAS: Perivascular
RAMALT: Tejido linfoide asociado a mucosa recto anal
TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral
SBEP: Subependimal
SBPL: Subpial
sECJ: Creutzfeldt-Jakob esporádico
Sho: Proteína Shadoo
SLR: Sistema linforreticular
SNC: Sistema nervioso central
SNE: Sistema nervioso entérico
SNP: Sistema nervioso periférico
SPRN: Gen codificante de la Sho
vECJ: Variante de la Enfermedad de Creutzfeld-Jakob
WB: Western Blot

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES.....	9
2.1.1 Scrapie	11
2.1.2 Encefalopatía espongiforme bovina	12
2.1.3 Enfermedad crónica caquetizante	13
2.1.4 Enfermedades priónicas humanas	13
2.2 ETIOLOGÍA DE LAS EET.....	15
2.2.1 Proteína prion celular (PrP^c)	16
2.2.2 Proteína prion patológica (PrP^{Sc})	17
2.2.3 Replicación de la PrP^{Sc}	18
2.3 TRANSMISIÓN DE LAS EET.....	20
2.3.1 Barrera de especies	21
2.4 PATOGENIA DE LAS EET.....	22
2.5 FACTORES GENÉTICOS.....	25
2.5.1 Gen <i>PRNP</i>	26
2.5.1.1 Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en ovino.....	27
2.5.1.2 Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en caprino.....	28
2.5.1.3 Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en bovino.....	31
2.5.1.4 Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en cérvidos.....	31
2.5.1.5 Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie humana.....	32
2.5.2 Gen <i>SPRN</i>	33
2.6 DIAGNÓSTICO DE LAS EET.....	34
2.6.1 Examen histopatológico	35
2.6.2 Técnicas de diagnóstico rápido	35
2.6.3 Inmunohistoquímica	36
2.6.4 Western Blot	36
2.6.5 Programa de vigilancia	37
2.7 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS.....	39
2.7.1 Perfil lesional de vacuolización	41
2.7.2 Perfil inmunohistoquímico	41
2.7.3 Patrón de glicosilación	42

3. ESTUDIO I: Efecto del genotipo del gen PRNP en la especie caprina sobre la susceptibilidad a la Encefalopatía Espongiforme Bovina	45
3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	47
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
3.2.1 Material. Animales	49
3.2.2 Métodos	49
3.2.2.1 Genotipado.....	49
3.2.2.2 Inoculación.....	50
3.2.2.3 Tratamientos reproductivos.....	51
3.2.2.4 Necropsia de los cabritos.....	51
3.2.2.5 Evaluación clínica.....	51
3.2.2.6 Extracción de muestras de sangre.....	52
3.2.2.7 Toma de muestras de biopsia rectal.....	52
3.2.2.8 Técnica de Necropsia.....	52
3.2.2.9 Técnicas diagnósticas.....	53
3.2.2.9.1 Histología.....	53
3.2.2.9.2 Inmunohistoquímica.....	53
3.2.2.9.3 ELISA.....	55
3.2.2.9.4 Western Blot.....	56
3.2.2.9.5 Bioensayo en ratón.....	56
3.3 RESULTADOS.....	58
3.3.1 Período de incubación y signos clínicos	58
3.3.2 Análisis histológico	61
3.3.3 Detección de la PrP^{Sc} en SNC y SNP	62
3.3.4 Detección de la PrP^{Sc} en SLR	67
3.3.5 Detección de la PrP^{Sc} en tracto gastrointestinal	70
3.3.6 Detección de la PrP^{Sc} en otros órganos y tejidos	71
3.3.7 Caracterización de cepas	73
3.3.7.1 Inmunohistoquímica.....	73
3.3.7.2 Western Blot.....	74
3.3.8 Bioensayo	77
3.4 DISCUSIÓN.....	78

4. ESTUDIO II: POLIMORFISMOS EN EL GEN PRNP. SELECCIÓN DE CAPRINOS RESISTENTES A LAS EET	87
4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	89
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	90
4.2.1 Muestras de sangre.....	90
4.2.2 Extracción del ADN.....	90
4.2.3 Amplificación y secuenciación del ADN.....	90
4.3 RESULTADOS.....	92
4.4 DISCUSIÓN.....	95
5. ESTUDIO III – Distintos factores genéticos que pueden influir en la susceptibilidad o resistencia a las EET	99
5.1 INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	101
5.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	102
5.2.1 Muestras de ADN.....	102
5.2.2 Extracción del ADN.....	102
5.2.3 Técnica de PCR y secuenciación del gen <i>SPRN</i>	102
5.2.4 Técnica de PCR y secuenciación de la región promotora del gen <i>PRNP</i>	103
5.3 RESULTADOS.....	104
5.3.1 Gen <i>SPRN</i>	104
5.3.2 Región promotora del gen <i>PRNP</i>	106
5.4 DISCUSIÓN.....	110
6. DISCUSIÓN GENERAL	113
7. CONCLUSIONES	119
7.1 CONCLUSIONS.....	123
8. RESUMEN	127
8.1 SUMMARY.....	133
9. ANEXOS	139
10. BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles animales y humanas.....	9
Tabla 2: Polimorfismos descritos en la especie caprina.....	29
Tabla 3: Cebadores PrP8 y PrP9.....	50
Tabla 4: Animales (genotipo y cepa de EEB) de los que provienen las muestras utilizadas para preparación de los inóculos y si las muestras son positivas o negativas mediante las técnicas diagnósticas.....	57
Tabla 5: Período de incubación, edad a la inoculación, período de supervivencia y duración de los signos clínicos de los animales con distintos genotipos y distintos inóculos.....	58
Tabla 6: Distribución de la PrP ^{Sc} en las distintas áreas del SNC y SNP mediante las técnicas de IHQ y ELISA.....	66
Tabla 7: Distribución de la PrP ^{Sc} en el SLR mediante las técnicas de IHQ y ELISA....	68
Tabla 8: Muestras con valor de corte por encima de 0,096 repetidas por duplicado.....	69
Tabla 9: Distribución de la PrP ^{Sc} en el tracto gastrointestinal mediante las técnicas de IHQ y ELISA.....	70
Tabla 10: Muestras con valor de corte por encima de 0.096 repetidas por duplicado (caprino, tejido, valores obtenidos en la primera prueba y en las repeticiones).....	71
Tabla 11: Distribución de la PrP ^{Sc} en otros órganos mediante las técnicas de IHQ y ELISA.....	73
Tabla 12: Genotipo en el codón 222, cepa de EEB, inóculos, días post inoculación.....	77
Tabla 13: Localización de muestreo de la cabra Moncaína.....	90
Tabla 14: Cebadores PrP8 y PrP9 utilizados para la técnica de PCR.....	91
Tabla 15: Frecuencia haplotípicas observadas en la raza Moncaína.....	92
Tabla 16: Frecuencias genotípicas observadas en la raza Moncaína.....	93
Tabla 17: Frecuencia de los genotipos y alelos encontrados en el gen <i>SPRN</i> en ciervo.....	104
Tabla 18: Frecuencia de los genotipos y alelos observados en el gen <i>SPRN</i> caprino....	105
Tabla 19: Frecuencia de genotipos y alelos observados en la región promotora del gen <i>PRNP</i> de ciervo.....	108
Tabla 20: Genotipos y frecuencias observados en la región promotora del gen <i>PRNP</i> según el origen de los ciervos.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de la proteína priónica celular (PrP ^C).....	16
Figura 2: Modelo de plegamiento asistido por molde.....	19
Figura 3: Modelo de nucleación sembrada.....	19
Figura 4: Representación de la estructura del gen <i>PRNP</i> en la especie humana, en el modelo murino y en rumiantes.....	26
Figura 5: Representación de la estructura del gen <i>SPRN</i> en la especie humana, en el modelo murino y en rumiantes.....	33
Figura 6: Actividades realizadas trimestralmente. A: Extracción de sangre. B: Técnica de biopsia retal.....	52
Figura 7: Áreas del SNC valoradas mediante la técnica de IHQ. 1: sustancia gris de la corteza cerebral, 2: sustancia blanca de la corteza cerebral, 3: núcleo caudado; 4: núcleo lenticular, 5: cápsulas internas y externas, 6: núcleo accumbens, 7, área septal, 8: tálamo dorsal, 9: tálamo ventral, 10: hipotálamo, 11: cuerpo geniculado lateral, 12: núcleo oculomotor, 13: núcleo rojo, 14: sustancia negra, 15: sustancia gris cerebelosa, 16: sustancia blanca cerebelosa, 17: núcleo cerebelar profundo, 18: núcleo vestibular, 19: núcleo facial, 20: núcleo cuneado lateral, 21: DMNV (núcleo motor dorsal del nervio vago), 22: núcleo hipogloso, 23: tracto espinal del nervio trigémino, 24: tracto espinocerebelar, 25: formación reticular, 26: rafe, 27: núcleos de la oliva; 28, 31, 34: Médula espinal (cervical, torácica y lumbar de izquierda a derecha); 29, 32, 35: cuerno dorsal; 30, 33, 36: cuerno ventral.....	54
Figura 8: Caprinos inoculados intracerebralmente con EEB con presencia de signos clínicos. A: Animal Q222Q con EEB bovina con presencia de hiperexcitabilidad. B: Animal K222K con EEB bovina con déficit propioceptivo. C: Animal K222K con EEB bovina con inclinación de la cabeza y debilidad de los miembros posteriores. D: Animal Q222K con EEB caprina con caquexia y estado mental deprimido. E: Animal K222K con EEB caprina con debilidad y dificultad para mantenerse de pie. F: Animal Q222Q con EEB bovina en fase terminal de la enfermedad.....	60
Figura 9: A: HE Obex de caprino genotipo Q222Q, tracto espinal del nervio trigémino con presencia de vacuolización en el neuropilo (10x). B: HE Obex caprino genotipo K222K, área de la formación reticular con presencia de vacuolización en el pericarión neuronal (20x).....	62

Figura 10: Detección de agregados de PrP ^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Sustancia negra y mesencéfalo (K222K con EEB bovina; 10x). B: Núcleo rojo y mesencéfalo (K222K con EEB bovina; 20x). C: Cápsula interna, externa y ganglios basales (Q222Q/G127S con EEB caprina; 5x). D: Capa plexiforme interna, capa plexiforme externa y células ganglionares, en la retina (Q222Q con EEB caprina; 20x).....	64
Figura 11: Detección de agregados de PrP ^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Macrófagos de cuerpo tingible y células foliculares dendríticas, linfonodo submandibular (Q222Q con EEB bovina; 20x). B: Bazo (Q222Q con EEB bovina; 20x).....	67
Figura 12: Tejido linfoide K222K inoculado con EEB bovina. A: Bazo con acumulo de PrP ^{Sc} en la región marginal del folículo linfoide (10x). B: Bazo con acumulo de PrP ^{Sc} en la región marginal del folículo linfoide (10x) C: Linfonodo poplíteo con acumulo de PrP ^{Sc} en el área cortical (5x). D: Linfonodo precural con acumulo de PrP ^{Sc} en el área peritrabecular (10x).....	69
Figura 13: Detección de agregados de PrP ^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Tejido linfoide, íleon (Q222Q con EEB bovina; 20x). B: Neuronas del plexo nervioso e íleon (Q222Q con EEB bovina; 20x).....	71
Figura 14: Detección de agregados de PrP ^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A y B: Husos nerviosos, músculo exocular (Q222Q con EEB bovina 5x y 40x). C: Husos nerviosos y fascículos nerviosos, músculo tríceps braquial (Q222K/G127S, con EEB caprina; 10x) D: Depósitos asociados a las células cromafines, glándula adrenal (K222K con EEB bovina; 20x).....	72
Figura 15: Muestra de mesencéfalo de una cabra Q222Q inoculada con EEB bovina. A: Anticuerpo L42 (20x). B: Anticuerpo P4 (20x).....	74
Figura 16: Western blot de obex de caprinos Q222Q y K222K inoculados con EEB bovina; bovino con EEB; control negativo, con los anticuerpos 6H4 (A) y P4 (B).....	75
Figura 17: Resultados del Western blot con el anticuerpo 6H4 de las muestras de obex de caprinos con distintos polimorfismos en los codones 222 y 127 inoculados con EEB bovina y EEB caprina, así como una muestra de bovino con EEB y un control negativo.....	76
Figura 18: Resultados del Western blot con el anticuerpo P4 de las muestras de obex de caprinos con distintos polimorfismos en los codones 222 y 127 inoculados con EEB	

bovina y EEB caprina, así como una muestra de bovino con EEB y un control negativo.....	76
Figura 19: Distintos genotipos en el codón 222. A: homocigoto glutamina (Q222Q), B: homocigoto lisina (K222K), C: heterocigoto glutamina/lisina Q222K).....	94
Figura 20: Fragmento 3`UTR del gen <i>SPNR</i> . A: inserción de CTCCC en la posición 602_606. B: delección en la posición 602.....	106
Figura 21: Polimorfismo indel en la posición 2038_2039pb. A: Ins./Ins. GC. B: Ins./Del. C: Del/Del.....	107

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparación entre el período de incubación y duración de los signos clínicos entre los siete animales inoculados con EEB.....	59
Gráfico 2: Comparación de la vacuolización de los distintos núcleos y áreas del SNC, entre los genotipos Q222Q y K222K (EEB bovina); y caprinos G127S (EEB caprina)...	61
Gráfico 3: Comparación entre el patrón de acumulación de PrP ^{Sc} entre los distintos grupos de animales, genotipos Q222Q y K222K, inoculados con EEB bovina.....	65
Gráfico 4: Comparación entre el patrón de acumulación de PrP ^{Sc} en los grupos de animales con distintos genotipos en el codón 127 (G127S y G127G.....)	65

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a los animales domésticos y silvestres como al hombre. Estas enfermedades se caracterizan por provocar una degeneración progresiva del sistema nervioso central (SNC), con presencia de signos nerviosos que evolucionan indefectiblemente a la muerte del individuo. Este grupo de enfermedades están causadas por un agente no convencional denominado prion, una proteína anómala (PrP^{Sc}) que se genera mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) presente en el hospedador de forma natural.

En total, se han descrito dieciséis enfermedades diferentes incluidas en el grupo de las EET: nueve que afectan a los seres humanos y siete a los animales, todos ellos mamíferos. En el caso de las enfermedades animales, las EET más importantes son el scrapie en ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en el ganado bovino y la enfermedad crónica caquetizante (ECC) en ciervos.

El scrapie en ovinos se describió por primera vez en 1732, y más tarde, en 1942, se describió en la especie caprina. La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) se detectó por primera vez en los años 80 en el Reino Unido y la hipótesis más probable sobre su origen, es que derivara de una adaptación del scrapie ovino a la especie bovina. Los bovinos se habrían infectado a partir del consumo de harinas de carne y hueso en las que la fuente de proteína habrían sido ovinos y caprinos infectados con scrapie. Estas enfermedades tomaron mayor importancia tras la asociación de la EEB, en el año 1996, con la aparición de una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (vECJ) en los seres humanos.

Esta epidemia tuvo una enorme repercusión a varios niveles, tanto social y sanitario, como económico y político; y, tras extenderse a otros países de la Unión Europea provocó una crisis alimentaria de grandes proporciones. Las medidas adoptadas por la Comisión Europea de vigilancia y control de la EEB lograron la casi erradicación de la enfermedad en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, no puede decirse que se haya erradicado totalmente puesto que todavía siguen detectándose casos en algunos países de la UE.

Otra importante EET que afecta a rumiantes es la ECC descrita por la primera vez en 1978, y que se ha descrito de forma natural en el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*),

en el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), en el alce de las montañas rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*) y en el alce Shira (*Alces alces shirasi*). Inicialmente esta enfermedad tenía su presencia limitada a Norte América y Corea del Sur, no obstante, recientemente ha sido diagnosticada en Europa. La gran capacidad de diseminación de esta enfermedad ha provocado un gran interés en la investigación sobre la susceptibilidad a la misma en las distintas especies de ciervos, su transmisión, su patología y las posibles herramientas de diagnóstico.

Considerando el riesgo que la EEB supone para la especie humana y los perjuicios no controlados que otras EET podrían ocasionar, se trabajó activamente para adoptar medidas de prevención y de selección de animales resistentes a estas enfermedades. Diversos estudios han demostrado que el gen *PRNP* ovino influye, no sólo en la resistencia a la enfermedad, sino que también puede influir en la patogenia de la misma. Así, se ha demostrado su relevancia en la diseminación de la PrP^{Sc} en el sistema linforreticular (SLR) el fenotipo de la enfermedad, particularmente en cuanto a la morfología y distribución de los agregados de PrP^{Sc} y en el papel que también podría desempeñar en la existencia de diferentes cepas productoras de scrapie.

La influencia del gen *PRNP* ha sido estudiada en otras especies, en particular, en la especie caprina tras el diagnóstico de su infección natural con EEB. Un gran número de cabras europeas fueron genotipadas y se encontraron determinados polimorfismos, los cuales podrían ser útiles a la hora de elaborar un programa de selección genética similar al del ovino. También se han realizado varios estudios en cérvidos con el fin de encontrar polimorfismos que protejan al animal frente a la infección por ECC e intentar frenar la gran diseminación de la enfermedad mediante la selección de animales con genotipos resistentes. En la especie bovina, por el contrario, ninguno de los polimorfismos conocidos dentro del fragmento OFR del gen *PRNP* tiene una gran influencia en la susceptibilidad a la EEB. No obstante, en la región no codificadora del gen, distintos estudios han revelado una asociación entre la susceptibilidad a la EEB y el polimorfismo de inserción / deleción en la región promotora del gen *PRNP*.

Diversos estudios han planteado que, además de la influencia del gen *PRNP* sobre las EET, el gen *SPRN* y la proteína Sho pueden estar implicados en estas enfermedades, proponiendo que Sho y PrP se unen al mismo receptor celular en su papel neuroprotector y que la perturbación de la expresión de Sho, en las enfermedades priónicas, aumenta la muerte neuronal. Suponiendo que Sho tiene un papel en las enfermedades priónicas, las diferencias genéticas en el gen *SPRN* en los rumiantes podrían contribuir a la

susceptibilidad y patogénesis del scrapie en ovinos y caprinos, de la EEB en el ganado bovino y de la enfermedad crónica caquetizante en ciervos.

En esta tesis se han incluido tres estudios cuyo objetivo común es contribuir a mejorar el conocimiento de los aspectos genéticos y su relación con la patogenia de las encefalopatías espongiformes transmisibles en rumiantes. Los trabajos que se han llevado a cabo así como sus objetivos son los siguientes:

Estudio I. Efecto del genotipo del gen *PRNP* sobre la susceptibilidad a la Encefalopatía espongiforme bovina en la especie caprina.

- Objetivo general: identificar el papel de los alelos K222 y S127 del gen *PRNP* caprino en la susceptibilidad o resistencia frente a la EEB bovina y caprina en cabras inoculadas por vía intracerebral.

- Objetivos específicos:

1. Determinar la influencia del genotipo del gen *PRNP* en la susceptibilidad de la especie caprina a la EEB.
2. Determinar la infectividad y distribución tisular de la EEB en cabras para así definir el riesgo de exposición humana a los productos caprinos contaminados.
3. Caracterización del agente causal mediante el patrón de glicosilación y el perfil inmunohistoquímico.
4. Valorar los métodos de diagnóstico para la diferenciación de la EEB en la especie caprina.

Estudio II. Selección de caprinos con polimorfismos en el gen *PRNP* resistentes a las EET.

- Objetivo general: realizar un estudio del gen *PRNP* en una raza de cabras autóctona de España en concreto la raza Moncaina, con el fin de establecer la frecuencia alélica de los polimorfismos que favorecen la resistencia frente a las EET.

- Objetivos específicos:

1. Determinar los polimorfismos del gen *PRNP* presentes en la población de la raza autóctona citada.
2. Establecer la frecuencia de los diferentes alelos encontrados, con especial interés en aquellos que están implicados en la resistencia a las EET.
3. Seleccionar los machos con alto valor genético, mantenerlos e intentar reproducirlos.

Estudio III. Estudiar los distintos factores genéticos que influyen en la susceptibilidad o resistencia a las EET

- Objetivo general: analizar los polimorfismos en el gen *SPRN* de distintas especies de rumiantes: ciervos de la especie Ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y cabras de la raza Alpina. Así como polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP* en ciervos.

- Objetivos específicos:

1. Determinar los polimorfismos del gen *SPRN* presentes en ciervos de la especie Ciervo rojo de España y Reino Unido, y en cabras de la raza Alpina.
2. Establecer la frecuencia de los diferentes genotipos y alelos encontrados en el gen *SPRN*.
3. Determinar los polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP* en ciervos de la especie ciervo rojo.
4. Establecer las frecuencias de los genotipos y alelos encontrados en la región promotora del gen *PRNP*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Las Encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), también conocidas como enfermedades priónicas, son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por presentar largos periodos de incubación, un curso clínico progresivo de evolución lenta, degeneración espongiforme del SNC y provocar la muerte del individuo. Este grupo de enfermedades afecta tanto a los animales domésticos y silvestres, como al hombre. En total se han descrito dieciséis enfermedades distintas, siete en animales y nueve en los seres humanos (Tabla 1) (Prusiner, 1982).

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles animales y humanas.

Animales		
Enfermedad	Hospedador	Origen
Scrapie	Ovino y caprino	Desconocido
Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Bovino	Infecioso
Enfermedad crónica caectizante (ECC)	Cévidos	Infecioso
Encefalopatía Espongiforme felina (EEF)	Felinos	Infecioso
Encefalopatía transmisible del visón (ETV)	Visón	Infecioso
Encefalopatía de ungulados exóticos (EUE)	Antílope	Infecioso
EET en primates no humanos	Lémur	Infecioso
Humanas		
Enfermedad	Hospedador	Origen
Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iECJ)	Hombre	Infecioso
Creutzfeldt-Jakob esporádico (sECJ)	Hombre	Espontáneo
Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ)	Hombre	Hereditario
Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	Hombre	Infecioso
Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Hombre	Hereditario
Insomnio familiar fatal (FFI)	Hombre	Hereditario
Insomnio esporádico fatal (IEF)	Hombre	Espontáneo
Kuru	Hombre	Canibalismo
Prionopatía variable sensible a la proteasa (PVSP _r)	Hombre	Espontáneo

Estas enfermedades están causadas por el acumulo de una proteína anómala (PrP^{Sc}), sobre todo en el SNC, que se genera mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) que está presente en el hospedador de forma natural. La PrP^{Sc} es capaz de inducir la transformación de la PrP^C en PrP^{Sc}, acumulándose así en el tejido nervioso, lentamente y sin remisión, hasta provocar la muerte del individuo afectado.

Las EET pueden manifestarse de tres formas distintas:

- Hereditarias: Cuando su presentación se debe a una mutación en el gen que codifica la proteína prión (*PRNP*). Así ocurre en la enfermedad de Gerstman-Straüsler-Scheinker y el Insomnio Fatal Familiar.
- Adquiridas: Cuando se produce una infección con el agente causal, como es el caso del kuru, de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) y de la mayoría de las EET animales.
- Esporádicas: Cuando no se ha identificado una causa aparente conocida, como en la ECJ esporádica (Imran y Mahmood, 2011).

La primera EET descrita fue la enfermedad de scrapie en el año 1732 en ovinos del Reino Unido (McGowan, 1922). Más tarde, en 1936, se comprobó su transmisibilidad por primera vez a través de la inoculación experimental de animales sanos con encéfalo y medula espinal de ovejas enfermas (Cuillé y Chelle, 1936) y en 1942 el scrapie se describió en la especie caprina (Chelle, 1942). Más tarde, en 1959, Hadlow relacionó el scrapie con una enfermedad endémica rara de tribus de Nueva Guinea, el kuru.

En los Estados Unidos en 1947 se detectó la encefalopatía transmisible del visón, una enfermedad rara que afecta al sistema nervioso central de visones criados en granjas, que ocasiona una enfermedad neurológica progresiva caracterizada por incoordinación locomotora, somnolencia, debilidad y muerte (Haybaeck y Heikenwa, 1965).

En los años 80, en el Reino Unido, tuvo lugar la epidemia de una enfermedad que afectaba el ganado bovino y que presentaba signos neuropatológicos similares a los observados en las ovejas con scrapie, que se denominó encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) (Wells *et al.*, 1987). Diez años más tarde, también en el Reino Unido, se describió un nuevo tipo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob denominada variante de Creutzfeldt-Jakob (vECJ), y que posteriormente, mediante a una serie de experimentos, se determinó que estaría vinculada con la EEB (Collinge *et al.*, 1996) .

Otra EET de gran importancia en los mamíferos es la enfermedad crónica caquetizante (ECC), que se diagnosticó por primera vez en 1978 en un ciervo mula

cautivo de Colorado (Williams y Young, 1980) y que con los años fueron diagnosticándose nuevos casos.

Otras enfermedades priónicas animales fueron identificadas, relacionadas con la transmisión de la EEB a otras especies, como la Encefalopatía espongiiforme de los felinos (Gruffydd-Jone *et al.*, 1991) y la encefalopatía de ungulados exóticos (Jeffrey y Wells, 1988).

2.1.1 Scrapie

El scrapie, tembladera o prurigo lumbar fue la primera EET descrita hace más de 270 años, en ovinos del Reino Unido (McGowan, 1922). Más tarde, en 1936, se comprobó su transmisibilidad, por primera vez, a través de la inoculación experimental de animales sanos con encéfalo y medula espinal de ovejas enfermas (Cuillé y Chelle, 1936) y en 1942 el scrapie se describió en la especie caprina (Chelle, 1942).

Fue a partir de la epidemia de la EEB en la década de los años 80, y su posible origen a partir del consumo de piensos contaminados elaborados con restos de animales infectados con scrapie, cuando se retomó el interés por la enfermedad en su forma natural. Como todas las EET, es una enfermedad letal, de carácter infeccioso, que presenta largos períodos de incubación, habitualmente de 2 a 5 años, y que tras la aparición de signos clínicos los animales afectados pueden vivir entre 1 y 6 meses (Collinge y Clarke, 2007).

Los animales afectados por esta enfermedad empiezan con cambios de comportamiento, que progresan a signos neurológicos más evidentes como son ataxia, prurito, hiperestesia y caquexia. Los signos clínicos pueden variar entre los animales afectados, pero las alteraciones de comportamiento más habituales son inquietud, hipoestesia, hiperexcitabilidad ante estímulos externos, resistencia al manejo y bruxismo, además del prurito, que es un signo típico de los animales con scrapie y que puede ocasionar áreas de alopecia por el rascado continuo (Healy *et al.*, 2003).

En 1998, en Noruega, se describió por primera vez el scrapie atípico, causado por la cepa Nor98, que posteriormente fue descrita en toda Europa. Las principales diferencias entre el scrapie clásico y el atípico están relacionadas con el perfil lesional y el genotipo animal. No obstante, las características clínicas, patológicas e inmunohisquímicas también difieren entre las dos formas de presentación de la enfermedad. En el scrapie atípico, los depósitos de PrP^{Sc} y las lesiones principalmente se encuentran en el cerebelo y no en el óbex como ocurre con el clásico; además, la PrP^{Sc}

no se detecta tan manifiestamente en tejidos periféricos (Gavier-Widen *et al.*, 2005) aunque se ha observado infectividad en SLR, nervios y músculos (Andreoletti *et al.*, 2011).

2.1.2 Encefalopatía espongiforme Bovina (EEB)

La encefalopatía espongiforme bovina fue descrita por la primera vez en 1986 (Wells *et al.*, 1987), en el Reino Unido y posteriormente en otros países de la Unión Europea. Los animales presentaban signos neurológicos similares a los de los ovinos afectados por scrapie y esa patología aún no había sido descrita en el ganado bovino, así que fue considerada como una nueva enfermedad denominada encefalopatía espongiforme bovina. Más tarde, en animales de edad avanzada, se identificaron dos fenotipos neuropatológicos y moleculares atípicos de la enfermedad y esas cepas atípicas se clasificaron en función de sus características biológicas y bioquímicas en dos grupos: la tipo L (L, del inglés low) y la tipo H (H, del inglés high) (Ducrot *et al.*, 2008; Jacobs *et al.*, 2007).

El origen de la enfermedad no se conoce muy bien, pero la hipótesis más aceptada la atribuye a la utilización de harinas de carne y hueso de ovinos infectados con scrapie en la alimentación del ganado vacuno. El reconocimiento de esta fuente de infección ha dado lugar a una serie de contramedidas tomadas por el Reino Unido y otros países para romper el ciclo de reinfección del ganado bovino, limitar la propagación geográfica de la enfermedad y eliminar las fuentes potenciales de nuevas infecciones.

Probablemente la medida más importante en el Reino Unido fue la prohibición del uso de proteínas derivadas de rumiantes en la alimentación animal. La pérdida de casi 200.000 animales enfermos, seguida de la destrucción preventiva y sacrificio de casi cuatro millones y medio de animales asintomáticos con más 30 meses de edad, paralizó la industria ganadera británica y afectó también a distintos mercados, como el de las grasas, la gelatina y las industrias farmacéuticas (Brown *et al.*, 2001).

El período de incubación de la EEB en bovinos es de aproximadamente 4 o 5 años, y los signos clínicos de la enfermedad incluyen anomalías del comportamiento, hiperreactividad, aprehensión, anomalías de la marcha, debilidad, pérdida de la condición corporal y decúbito (Konold *et al.*, 2004).

Esta enfermedad tiene la capacidad de transmitirse a otras especies (Bruce *et al.*, 1994), como se ha demostrado al detectar un caso de EEB natural en la especie caprina

en Francia (Eloit *et al.*, 2005) y por la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en humanos, lo que tuvo una gran repercusión en la seguridad alimentaria y en la salud pública, considerada como la causa de una de las mayores crisis alimentarias de las últimas décadas.

2.1.3 Enfermedad Crónica Caquetizante (ECC)

La ECC se diagnosticó por primera vez en 1978 en un ciervo mula cautivo de Colorado (Williams y Young, 1980), poco después fue diagnosticada en un alce de Wyoming (Williams y Young, 1982) y con los años fueron diagnosticándose nuevos casos. Es una enfermedad común en Norte América que afecta a distintas especies de cérvidos como el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el alce de las Montañas Rocosas (*Cervus canadensis nelsoni*) y el alce (*Alces alces*) (Baeten *et al.*, 2007; Spraker *et al.*, 1997; Williams y Young, 1980). Además, en Corea del Sur también se ha descrito en el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y en el ciervo sika (*Cervus nippon*), como fruto de la importación de animales de Norte América infectados por ECC (Lee *et al.*, 2013). En 2016 se describió el primer caso en Europa, en renos de vida libre en Noruega, y su origen todavía es desconocido (Benestad *et al.*, 2016).

Los signos clínicos de esta enfermedad se han observado principalmente en animales en cautiverio y suelen ser sutiles, variando según el caso (Gajdusek, 2005). Los primeros signos son inespecíficos e incluyen cambios de comportamiento como: apatía, aislamiento del grupo, cabeza y orejas bajas, hiperexcitabilidad, seguidas de pérdida de peso. Los cérvidos pueden presentar también poliuria/polidipsia, hipersalivación, rechinar de dientes, regurgitación frecuente y dificultad para tragar. Además, se han descrito casos de neumonía por aspiración secundaria o bien una evolución fatal del cuadro clínico debido el estrés. La duración de la enfermedad clínica suele tardar desde semanas a meses, variando entre los individuos (Benestad *et al.*, 2016).

2.1.4 Enfermedades priónicas humanas

Las EET que afectan a la especie humana incluyen: los diferentes tipos de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ), el kuru, las diferentes formas del insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstman-Straüsler- Scheinker (GSS).

El primer caso de la ECJ se describió en 1920, cuando el médico Alemán Gerhard Creutzfeldt describió una paciente de 22 años que presentaba una enfermedad neurológica progresiva, con signos clínicos que incluían mioclonía, paresia y deterioro mental severo, además de presentar pérdida neuronal y astrogliosis. En los años siguientes, Alfons Jakob (1921a, 1921b), describió a cinco pacientes que padecían de un trastorno con características neuropatológicas similares. En 1922, Spielmeyer denominó a esos casos como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) y posteriormente el término se utilizó para describir un rango de condiciones neurodegenerativas.

Esta enfermedad se ha descrito en todo el mundo y su origen suele ser esporádico o iatrogénico, y una minoría de los casos de origen genético asociándose a mutaciones en el gen *PRNP*. La ECJ clásica (esporádica) es una demencia de progresión rápida, que generalmente se manifiesta en personas con edad entre 45 y 75 años, con un pico de aparición entre los 60 y 65 años. La progresión clínica es de semanas, evolucionando a un trastorno de comportamiento caracterizado por la incapacidad para moverse o hablar, y alrededor del 70% de los afectados mueren en menos de 6 meses (Collinge, 2001). Entre 1994 y 1995, se describieron en el Reino Unido diez casos de la ECJ cuyos cambios neuropatológicos y clínicos tenían características diferentes y además, habían sido diagnosticados en personas relativamente jóvenes, lo que no era común en la enfermedad. Así, en 1996 se describió el primer caso de la llamada Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt Jakob (vECJ) (Will *et al.*, 1996).

El Kuru fue descrito en 1957 por Gajdusek y Zigas en individuos de tribus de Papúa Nueva Guinea, que presentaban pérdida de coordinación, temblores, seguida de demencia y muerte. Se observó que los principales grupos afectados eran mujeres adultas y niños de ambos sexos y se relacionó con rituales de canibalismo. Su transmisibilidad se comprobó posteriormente mediante la infección experimental de chimpancés con tejido cerebral humano infectado (Gajdusek *et al.*, 1966; Gajdusek *et al.*, 1967). Con la abolición de las prácticas de canibalismo, los casos del Kuru empezaron a disminuir, no obstante, casi 20 años después, aún se describió un caso asociado a un largo periodo de incubación (Prusiner *et al.*, 1982).

El GSS es un trastorno autosómico dominante que generalmente se presenta con ataxia cerebelosa crónica con características piramidales, ocurriendo posteriormente fenómenos de demencia. Histológicamente, la característica distintiva de esta enfermedad es la presencia de placas amiloides multicéntricas. Inicialmente se asociaba con la

mutación P102L del gen *PRNP* (Hsiao *et al.*, 1989), pero en la actualidad se reconoce como un síndrome patológico asociado a distintas mutaciones en ese gen.

El IFF se describió por la primera vez en 1986, tras la descripción de dos casos de una enfermedad familiar de progresión rápida caracterizada por insomnio intratable, disautonomía y signos motores (Lugaresi *et al.*, 1986). Es una enfermedad autosómica dominante causada por la mutación D178N en el gen *PRNP* en combinación con metionina en el codón 129 (Medori *et al.*, 1992). Los signos clínicos incluyen principalmente alteraciones del sueño acompañadas, alucinaciones, delirio y mioclonía. La edad de inicio y la duración de la enfermedad son variables dependiendo en parte de la presencia de los aminoácidos metionina o valina en el codón 129 del gen *PRNP* (Capellari *et al.*, 2011).

2.2 ETIOLOGÍA DE LAS EET

Se han propuesto numerosas teorías acerca de la naturaleza del agente causal de las EET. La primera hipótesis describió el scrapie como una enfermedad muscular causada por parásitos (M'Fadyean, 1918), pero más tarde su transmisibilidad fue comprobada debido al carácter infeccioso que las muestras procedentes de los animales enfermos mantenían tras su filtración por filtros específicos para virus (Wilson *et al.*, 1950). Ese hecho hizo que durante muchos años los investigadores acreditaran que la causa de estas enfermedades era un virus lento. Más tarde, se observó que no era posible inactivar el agente causal a través de las técnicas convencionales de luz ultravioleta (UV) y radiación ionizante (Alper *et al.*, 1967), lo que dio lugar a un gran número de hipótesis sobre la naturaleza química del agente del scrapie, como la formulada por Griffith en 1967, la cual proponía que los agentes causantes del scrapie eran unas proteínas auto-replicantes.

Más tarde, Prusiner en 1982 propuso que las EET eran causadas por una partícula proteínica infecciosa capaz de autoreplicarse y carente de ácidos nucleicos, que la denominó prion. Esta teoría asocia el comienzo de la enfermedad a un cambio en la estructura terciaria de la proteína prión normal (PrP^{C}), que sufre una alteración conformacional y que la transforma en una proteína prión patológica (PrP^{Sc}).

Otras teorías han sido contempladas por algunos investigadores, como la hipótesis del virino (Dickinson y Outram, 1988). Según esta teoría, se propone que el agente causal del scrapie podría ser una molécula quimérica, constituida por una proteína codificada

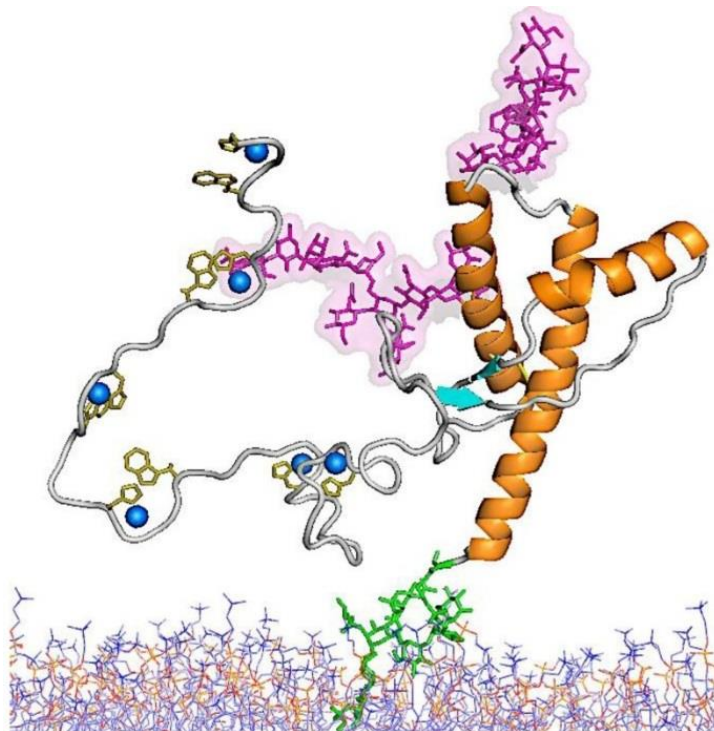
por el hospedador y un ácido nucleico, no codificante, propio del agente infeccioso, estando el ácido nucleico protegido y camuflado por proteínas del huésped.

Actualmente la hipótesis más aceptada es la de Prusiner. Sin embargo, ésta todavía no ha proporcionado respuestas convincentes a ciertas cuestiones como el hecho de la existencia de distintas cepas priónicas.

2.2.1 Proteína prion celular (PrP^C)

La PrP^C (Figura 1) es una glicoproteína de peso molecular de 33-35 kDa, anclada a la membrana celular mediante la fracción glicofosfatidilinositol. Está codificada por el gen *PRNP* y consta aproximadamente de 250 aminoácidos, dependiendo de la especie animal (Caughey *et al.*, 1989; Monari *et al.*, 1994).

Figura 1: Representación de la proteína priónica celular (PrP^C).



Adaptado: Millhauser (2013)

Es una proteína fisiológica que está presente en la mayoría de los mamíferos (Diaz-San Segundo *et al.*, 2006) y que desempeña un papel clave en la patogénesis de las enfermedades priónicas. La PrP^C se expresa a principios de la embriogénesis y en el adulto está presente en los niveles más altos en las neuronas del encéfalo y en la médula

espinal (Manson *et al.*, 1992). En niveles más bajos, también se encuentra en las células gliales del SNC, así como en diferentes tipos de células periféricas (Ford *et al.*, 2002; Moser *et al.*, 1995). El sistema linforreticular (SLR) también presenta altos niveles de expresión, especialmente en linfocitos y células dendríticas foliculares (Aguzzi y Heikenwalder, 2006).

En estudios realizados en la especie ovina se ha observado que el órgano con mayor cantidad de PrP^C es el encéfalo, detectándose de 20 a 50 veces más cantidad que en el resto de los tejidos analizados, seguido del pulmón, músculo esquelético, corazón, útero, timo y lengua. En otros tejidos, así como en el tracto gastrointestinal, los niveles de PrP^C son bajos y distintos en función de la especie animal. El hígado es el tejido que contiene la concentración más baja de PrP^C, entre 564 y 16.000 veces menos que en el encéfalo (Moudjou *et al.*, 2001).

Su función fisiológica aún no se conoce con seguridad, pero diversos estudios indican que la PrP^C puede ejercer distintas funciones, entre ellas se considera que desempeña un papel importante en la supervivencia y en la adhesión celular, en la maduración y formación de las prolongaciones de las neuronas, en la protección frente a la muerte neuronal, en la formación de la memoria y finalmente en la modulación de la respuesta inmune en las inflamaciones (Linden *et al.*, 2008). En el sistema inmune innato la PrP^C se expresa en células presentadoras de antígeno. Recientemente se ha estudiado la posible contribución de esta proteína en las interacciones de las células T con las células dendríticas, mediadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. Así, se ha observado que la ausencia de PrP^C en células dendríticas provoca una respuesta reducida de los linfocitos T (Ballerini *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que la PrP^C cumple una función en el metabolismo del cobre, y que ligada a este metal, tiene un papel importante en la protección celular contra los daños causados por radicales libres (Westergard *et al.*, 2007).

2.2.2 Proteína prion patológica (PrP^{Sc})

La PrP^{Sc} es una isoforma anormal de la glicoproteína de membrana citoplasmática codificada por el hospedador (PrP^C). Ambas isoformas están codificadas por el mismo gen y presentan la misma secuencia aminoacídica, difiriendo en la estructura secundaria (Prusiner, 1990). Tiene un peso molecular de 27-30 kDa (Prusiner, 1998) y presenta distintas características físicas y químicas respecto a la PrP^C, como una movilidad

electroforética y un perfil de la glicofoma distintos, una resistencia parcial a las proteasas y la imposibilidad de ser inactivada por el uso de formaldehído, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), nucleasas, radiación ultravioleta o radiación ionizante (Alper *et al.*, 1966).

También se ha descrito que la proteína PrP^{Sc} puede unirse fuertemente a algunas superficies, incluidas las de acero inoxidable y plástico, sin perder infectividad, incluso se piensa que unida al metal parece ser altamente resistente a la descontaminación. En el medio ambiente, una vez contaminado, puede permanecer años infectivo, debido a la fuerte interacción del prion con el suelo (Johnson *et al.*, 2006). En Islandia se han descrito campos y corrales que tras un periodo de vacío sanitario de al menos 3 años, animales sanos que repoblaron las explotaciones infectadas antiguamente, desarrollaron scrapie. Incluso se han descrito casos después de 16 años de vacío sanitario (Georgsson *et al.*, 2006).

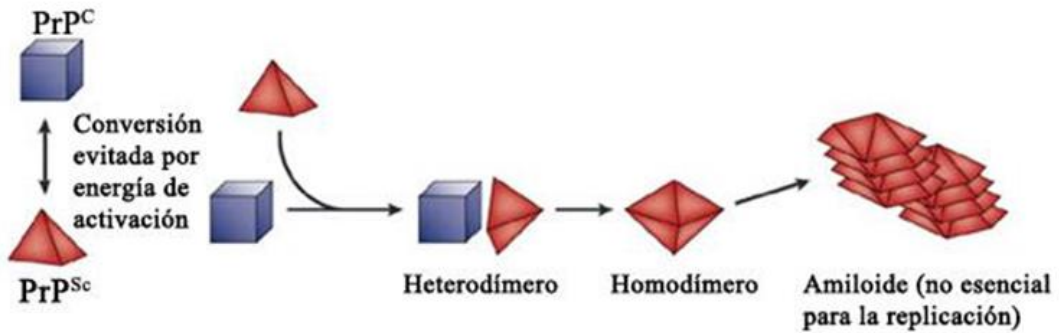
La transformación de PrP^C a PrP^{Sc} consiste en un cambio conformacional (Pan *et al.*, 1993) y se realiza por un mecanismo de post-traslación (Caughey y Raymond 1991). Éste se basa en que, mientras que la PrP^C muestra una alta presencia de hélices alfa y bajo contenido de láminas beta en su estructura, tras el cambio, se observa un alto porcentaje de estructura β y disminución de la estructura α (Pan *et al.*, 1993). Así, la PrP^C tiene un 42% de hélices alfa y solamente un 3% de láminas beta, mientras en la PrP^{Sc} aumenta hasta un 43% las láminas plegadas beta y disminuyen las hélices alfa en un 30% (Pan *et al.*, 1993).

2.2.3 Replicación de la PrP^{Sc}

Distintos experimentos han demostrado que la presencia de PrP^C es necesaria para la replicación de la PrP^{Sc}, puesto que al infectar ratones knock-out Prnp^{-/-} (Bueler *et al.*, 1993), así como en recientes estudios con la técnica de PMCA (amplificación cíclica de proteínas mal plegadas) (Castilla *et al.*, 2005), el proceso de conversión no se lleva a cabo.

Actualmente se contemplan dos hipótesis para explicar el cambio conformacional de la PrP^C en PrP^{Sc}. Por un lado, el modelo de plegamiento asistido por molde (Figura 2), el cual propone que la PrP^{Sc} actúa como un molde para que la PrP^C se convierta en PrP^{Sc} (Come *et al.*, 1993). La PrP^{Sc} sería responsable de la disminución de la energía requerida que evita la transformación espontánea de PrP^C en PrP^{Sc} (Aguzzi y Polymenidou, 2004, Aguzzi y Calella, 2009).

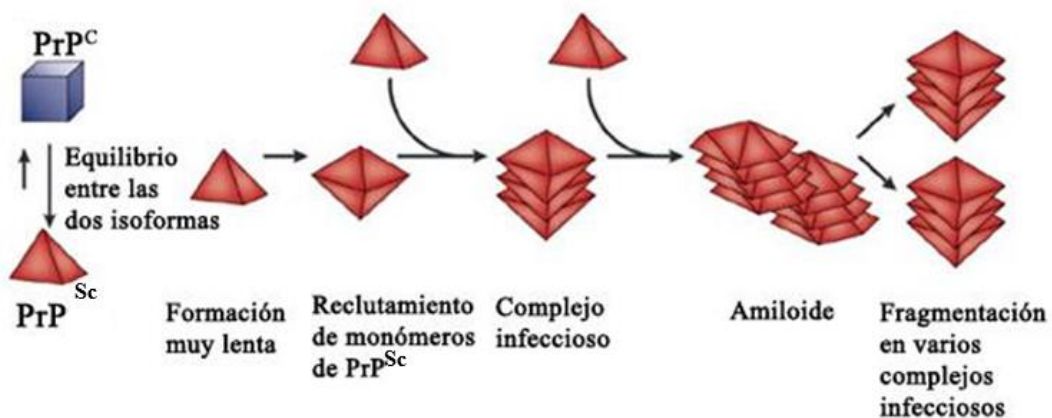
Figura 2: Modelo de plegamiento asistido por molde.



Adaptado: Aguzzi y Sigurdson (2004)

Por otro, la hipótesis de nucleación sembrada (Figura 3), en la que se sugiere que ambas isoformas se encuentran en estado de equilibrio, de forma que en un hospedador sano el equilibrio se desplaza ampliamente hacia la PrP^C. De acuerdo con esa hipótesis, el agente infeccioso consistiría en un agregado altamente ordenado de moléculas de PrP^{Sc} de tipo amiloide. Este conjunto se formaría a partir de un núcleo o semilla que contendría un grupo de moléculas de PrP^{Sc}. Estos grandes polímeros serían capaces de inducir un cambio masivo sobre las moléculas normales, convirtiéndolas en moléculas de conformación anómala (Aguzzi y Polymenidou, 2004; Caughey *et al.*, 1991; Come *et al.*, 1993).

Figura 3: Modelo de nucleación sembrada.



Adaptado: Aguzzi y Sigurdson (2004)

2.3 TRANSMISIÓN DE LAS EET

La puerta de entrada del prion depende de la exposición a la que ha sido sometido el individuo. La exposición oral es la vía más relevante para adquirir la enfermedad de forma natural, el prion primero atraviesa la pared del tracto digestivo, resistiendo a la exposición a enzimas digestivas y a la acidez gástrica. De hecho, según un estudio en el que se inocularon ratones por vía intragástrica, se demostró que la PrP^{Sc} se acumulaba rápidamente en las placas de Peyer antes de acumularse en el bazo (Kimberlin y Walker, 1989). También se ha demostrado, en infecciones experimentales, que la susceptibilidad a la infección por la vía oral se correlaciona positivamente con el número de placas de Peyer que están presentes en el intestino delgado (Prinz *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren que el epitelio folicular asociado a las placas de Peyer puede ser un sitio de entrada para los priones.

En el scrapie, la principal fuente de contaminación son restos de placenta expulsados por animales infectados durante el parto, sin embargo la transmisión también puede ocurrir de forma vertical o materna, a través de la ingestión de leche y calostro (Konold *et al.*, 2008) o por vía intrauterina (Foster *et al.*, 2013; Garza *et al.*, 2011).

En la epidemia de la EEB, producida en los años 90, se comprobó que la forma de transmisión fue la utilización de harinas de carne y hueso elaboradas con restos de animales infectados por una EET en la alimentación de los bóvidos. Tras la retirada de dichas harinas, la incidencia de EEB se redujo drásticamente (Wilesmith *et al.*, 1991, Wilesmith *et al.*, 1992). En el caso del ganado vacuno no se ha descrito, en condiciones naturales, que el agente de la EEB se transmita horizontalmente mediante excreciones o secreciones, ni tampoco verticalmente por descendencia materna (Curnow y Hau, 1996, Wrathall *et al.*, 2002). No obstante, en el año 2005 se detectó la infección de dos corderos nacidos de ovejas experimentalmente inoculadas por vía oral con el agente de la EEB bovina, comprobando que la EEB en pequeños rumiantes puede transmitirse maternalmente, aunque no se haya podido comprobar si dicha transmisión tuvo lugar in útero o fue perinatal (Bellworthy *et al.*, 2005).

La transmisión del agente causal de la ECC es muy similar a la del scrapie clásico en el ovino, produciéndose de forma horizontal. Esa puede ocurrir mediante el contacto directo entre los animales, en el cual la saliva parece tener un papel importante en la transmisión (Mathiason *et al.*, 2006). Sin embargo, se considera como principal causa de

diseminación la contaminación ambiental a partir de excreciones procedentes de animales infectados (Haley *et al.*, 2009a; Haley *et al.*, 2009b; Safar *et al.*, 2008; Tamguney *et al.*, 2009).

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, puede ocurrir de tres formas distintas: iatrogénica, esporádica o familiar, siendo solo la ECJ iatrogénica la que se asocia a la utilización de instrumentos contaminados esterilizados de forma inadecuada. También se ha detectado que se puede asociar a la utilización de la hormona de crecimiento extraída de las glándulas pituitarias de pacientes afectados. En la vECJ, tras observarse que las personas afectadas eran más jóvenes de lo normal y que presentaban una patología distinta, se sugirió que se podría tratar de una nueva enfermedad probablemente asociada a la ingestión de productos de origen vacuno contaminados.

El príon se puede detectar en sangre asociado a linfocitos T, monocitos o a células mononucleares (Dassanayake *et al.*, 2016) habiendo estudios que demuestran que puede ser transmitido eficientemente a través de la sangre y sus derivados. En ovejas, la EEB y el scrapie se han transmitido a través de transfusiones de sangre entera y de células blancas, incluso de donantes subclínicos (Houston *et al.*, 2000). De forma similar, la ECC se ha transmitido mediante transfusión sanguínea a ciervos (Mathiason *et al.*, 2006), y la vECJ por donaciones de sangre de humanos subclínicos que posteriormente desarrollaron la enfermedad (Llewelyn *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2013).

Estudios experimentales también han indicado que los priones pueden transmitirse a través de la piel (Mohan *et al.*, 2004; Mohan *et al.*, 2005; Glaysher y Mabbott, 2007) y aerosoles (Haybaeck *et al.*, 2011; Denkers *et al.*, 2013; Nichols *et al.*, 2013), colonizando los linfonodos poco después de la exposición al agente. En la transmisión con aerosoles, las células M y las células epiteliales de la mucosa nasal parecen estar implicadas en el transporte del prion (Kincaid *et al.*, 2012).

2.3.1 Barrera de especies

La “barrera de especies” en las enfermedades priónicas se define como la resistencia que un individuo presenta a infectarse con una EET proveniente de otra especie. Esa barrera, en la primera exposición, puede ser muy importante e incluso conducir a periodos de incubación que exceden la vida útil del individuo. Sin embargo, una vez que la cepa de priones se ha transmitido por primera vez a una especie, generalmente se adapta a su nuevo huésped y su transmisión se hace más eficiente, con

un mayor número de individuos que sucumben a la enfermedad y tiempos de incubación más cortos que los observados en la primera transmisión (Priola, 1999).

A nivel molecular, inicialmente se creía que la barrera de transmisión estaba condicionada por completo por el grado de similitud de la secuencia de aminoácidos de la PrP entre especies donadoras y receptoras. Ahora se conoce que esta regulación no es completa pero sí muy relevante ya que durante la infección priónica se requiere una interacción física altamente específica entre la PrP^C y la PrP^{Sc} para la conversión de los priones. Así, cambios mínimos en la secuencia de los aminoácidos de la PrP^C tienen un gran impacto en la susceptibilidad de una especie a la infección con una cepa de prion específica. Muchos estudios han apoyado esta suposición, como por ejemplo el que comparó la susceptibilidad a la PrP^{Sc} de la Encefalopatía transmisible del visón de la comadreja negra frente al visón, mostrando una susceptibilidad distinta cuando fueron inoculados con el mismo aislado (Bartz *et al.*, 1994). Las estructuras primarias de la PrP^C de estos dos mustélidos solo difieren en dos residuos de aminoácidos, lo que podría ser la causa de las distintas susceptibilidades.

Además de las variaciones interespecíficas en las secuencias de aminoácidos, las variantes alélicas en el gen *PRNP* pueden afectar a la eficacia de la transmisión de la enfermedad priónica. En humanos, la susceptibilidad a vCJD y a la EEB está modulada por el polimorfismo V/M (valina/metionina) en el codón 129. Los casos de vCJD solo se han observado en personas que son homocigóticas metionina en el codón 129 (Collinge y Clarke, 2007), mientras que los experimentos con ratones transgénicos han demostrado que la presencia de valina en ese codón actúa como una barrera de transmisión para el agente de la EEB, produciendo así alteraciones en el fenotipo de la enfermedad (Wadsworth *et al.*, 2004).

2.4 PATOGENIA DE LAS EET

En la mayor parte de las EET, el prion se acumula y se replica en los órganos linfoides secundarios antes de que ocurra la neuroinvasión. Así enfermedades como el scrapie natural (Pattison y Millson, 1960), la enfermedad crónica caquetizante (Sigurdson *et al.*, 1999), la encefalopatía transmisible del visón (Hadlow *et al.*, 1987) y la variante de Creutzfeldt-Jakob (Hilton *et al.*, 1998), son consideradas linfotrópicas, en comparación con el scrapie atípico (cepa Nor98), ya que éste se caracteriza por una baja o nula implicación del SLR en la patogenia de la enfermedad (Andreoletti *et al.*, 2011).

También se ha observado que los priones linfotrópicos parecen tener un rango de huéspedes superior en comparación con los priones neurotrópicos, en los que la invasión ocurre directamente en el SNC sin requerir una fase de replicación periférica (Beringue *et al.*, 2012).

En los casos en los que la PrP^{Sc} se acumula en el tejido linfoide, como en el scrapie clásico la PrP^{Sc} se acumula en primer lugar en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT: del inglés, Gut-Associated Lymphoid Tissue), principalmente en las placas de Peyer del íleon y yeyuno, linfonodos mesentéricos y tonsilas, y posteriormente, se observa el depósito en otros tejidos linfoides (Andreoletti *et al.*, 2000, van Keulen *et al.*, 2000). El depósito del prion en los tejidos como tonsila y mucosa rectal puede favorecer el diagnóstico preclínico de estas enfermedades, como es el caso de la vECJ (Hill *et al.*, 1997) y del scrapie (Gonzalez *et al.*, 2006).

Diversos estudios han identificado a las células dendríticas foliculares (CDF) como un sitio de acumulación de la PrP^{Sc} en los tejidos linfoides de ratones infectados (Kitamoto *et al.*, 1991). Además, las CDF expresan altos niveles de PrP^C, pudiendo ser unas buenas candidatas para la replicación de la PrP^{Sc} en tejidos periféricos. De hecho, el tratamiento con una inmunoglobulina soluble del receptor de la linfotóxina β (LT β R-Ig) tiene como consecuencia la ablación de las CDFs maduras del bazo, y se ha visto que ello suprime la acumulación del prion en ese órgano y ralentiza la neuroinvasión tras la inoculación intraperitoneal con scrapie (Montrasio *et al.*, 2000). Sin embargo no altera la patogénesis del prion después de la inoculación intracerebral (Mabbott *et al.*, 2000). Efectos similares también se han obtenido utilizando un inhibidor del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Mabbott *et al.*, 2002). No obstante, la desdiferenciación de las CDFs tras el tratamiento con LT β R-Ig es eficiente si se aplica antes de la inoculación del prion, intraperitoneal u oral, pero no después (Mabbott *et al.*, 2003). También, los ratones que carecen de LT α , LT β , LT β R, LT α y TNF, son resistentes a la infección intraperitoneal y no se ha encontrado la PrP^{Sc} en el bazo, pero si en los linfonodos (Prinz *et al.*, 2002). De esta forma, estos datos indican que las CDFs desempeñan un papel crucial en los tejidos linfoides en la retención periférica temprana y la replicación de cepas linfotrópicas del prion. Además, la desdiferenciación de las CDFs podría representar una opción válida en la profilaxis post-exposición contra la PrP^{Sc} (Aguzzi y Sigurdson, 2004).

Tras acumularse en el tejido linfoide, el prion pasa al sistema nervioso entérico (SNE), que parece ser el punto de entrada del agente causal en el SNP (van Keulen *et al.*, 2002). Eso podría producirse una vez que el prion atraviesa la barrera intestinal y así

contactar directamente con las terminaciones nerviosas del plexo submucoso, que se encuentran inmediatamente debajo del epitelio intestinal (Jeffrey *et al.*, 2006a). Tras la neuroinvasión del sistema nervioso entérico, el prion sigue en sentido retrógrado a través de nervios eferentes parasimpáticos y simpáticos que inervan el intestino hacia el núcleo dorsal del nervio vago (van Keulen *et al.*, 2000). Una vez alcanzado el SNC la PrP^{Sc} se disemina ocasionando neurodegeneración espongiiforme y una pérdida neuronal progresiva. El prion también puede diseminarse de forma centrífuga a través del SNP, alcanzando y acumulándose en distintos tejidos y órganos. En el caso del scrapie se ha demostrado que la PrP^{Sc} también puede acumularse en otros órganos y tejidos, como:

- Glándula adrenal: en la medular de ovinos (Jeffrey *et al.*, 2001, Garza *et al.*, 2014), así como en la medular y en la región fascicular del cortex en caprinos (Acin *et al.*, 2013). Garza y colaboradores también describen que los depósitos de PrP^{Sc} situados inmediatamente debajo de la cápsula de la glándula adrenal, parecen estar asociados a neuronas posganglionares y nervios que discurren hacia el interior de la sustancia glandular, transportados por delgados elementos de tejido conectivo que parten de la capsula.

- Corazón: en los miocitos cardíacos (Garza *et al.*, 2014).

- Músculo esquelético: en miocitos de los músculos psoas mayor, supraespinal y semimembranoso (Andreoletti *et al.*, 2004), así como en las fibras intrafusales de los husos neuromusculares (Garza *et al.*, 2014).

- Glándula mamaria: la presencia de la PrP^{Sc} en este órgano parece estar relacionada con procesos inflamatorios crónicos causados por el virus Maedi Visna en ovejas (Lacroux *et al.*, 2008, Ligios *et al.*, 2005) y por el virus de artritis encefalitis caprina en las cabras (Gonzalez *et al.*, 2010).

- Glándulas salivares: se ha detectado PrP^{Sc} asociada a células epiteliales de los conductos y acinos de las glándulas parótida, mandibular, bucal, palatina y labial de ovejas (Vascellari *et al.*, 2007). En cabras sólo se ha podido detectar la PrP^{Sc} en un caso tras inoculación intracerebral (Acutis *et al.*, 2012).

- Riñón: se describen depósitos de PrP^{Sc} en la papila renal de ovejas (Siso *et al.*, 2008; Garza *et al.*, 2014) y en cabras sólo se ha podido detectar la PrP^{Sc} en un caso tras inoculación intracerebral (Acutis *et al.*, 2012).

- Vejiga de la orina: Garza y colaboradores (2014) observaron depósito de PrP^{Sc} en un caso natural de scrapie en ovejas, en las fibras del músculo liso de la pared, y en cabras

sólo se ha podido detectar la PrP^{Sc} en un caso tras inoculación intracerebral (Acutis *et al.*, 2012).

- Piel: recientemente se detectó por primera vez PrP^{Sc} en el estrato basal de la epidermis de una oveja (Garza *et al.*, 2014), siendo infructuoso todo intento de encontrar acumulación en el caso de cabras.

- Pulmón: los depósitos de PrP^{Sc} en este órgano han sido descritos solo en ovejas y suelen estar asociados a lesiones inflamatorias compatibles, por ejemplo, con el virus de Maedi Visna y/o bronconeumonías verminosas (Jeffrey y Gonzalez, 2007; Ryder *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2010; Garza *et al.*, 2014).

- Hígado: se ha detectado depósito de PrP^{Sc} en las células de Kupffer en ovinos (Everest *et al.*, 2011), así como en folículos linfoides asociados a conductos biliares en animales con lesiones compatibles con dicroceliosis (Garza *et al.*, 2014). En caprino no se ha detectado acumulación de la proteína en este órgano.

- Páncreas: Se han observado depósitos de PrP^{Sc} asociados a neuronas post ganglionares localizadas dentro del parénquima pancreático en ovejas (Garza *et al.*, 2014), no habiendo sido descrito en la especie caprina.

2.5 FACTORES GENÉTICOS

En los mamíferos, la familia de los genes que codifica las proteínas priónicas contiene actualmente tres genes conocidos: *PRNP* (codifica la proteína prion, PrP), *SPRN* (codifica la proteína shadoo, Sho) y *PRND* (codifica la proteína doppel, Dpl) (Premzl *et al.*, 2003; Premzl y Gamulin, 2007; Watts y Westaway, 2007). La PrP y la Sho se expresan de manera mayoritaria en las neuronas del SNC (Hu *et al.*, 2007; Watts *et al.*, 2007), mientras que la Dpl parece ser específica del aparato reproductor (Genoud *et al.*, 2003).

En la mayor parte de las especies afectadas por las enfermedades priónicas, la susceptibilidad y la patogénesis son moduladas por el gen *PRNP*. En los animales de las especies ovina y caprina, el control de la enfermedad está ligado de manera compleja a genotipos específicos. Sin embargo, no todas las ovejas con el mismo genotipo en el gen *PRNP* son igualmente susceptibles o desarrollan la patología de la misma manera (Goldmann, 2008), lo que puede sugerir la participación de otros genes.

Watts y colaboradores (2007) plantearon la hipótesis de que el gen *SPRN* y la proteína Sho podrían estar implicados en esas enfermedades, proponiendo que Sho y PrP

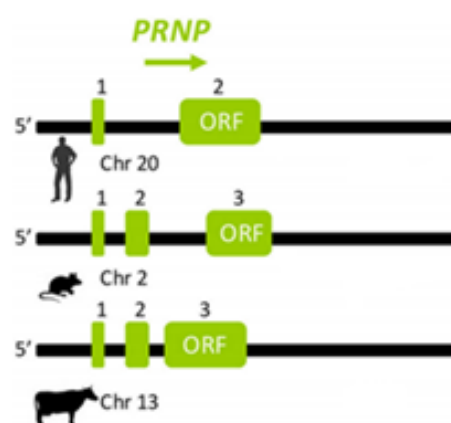
se unen al mismo receptor celular en su papel neuroprotector y que la alteración de la expresión de Sho, en las enfermedades priónicas, aumenta la muerte neuronal.

Diversos estudios han sugerido una estrecha correlación entre la expresión de los genes *PRNP* y *SPRN* en el tejido cerebral de la especie ovina (Gossner *et al.*, 2009; Lampo *et al.*, 2009), demostrando la necesidad de comprender la genética de expresión de ambos genes. Suponiendo que Sho tiene un papel en las enfermedades priónicas, las diferencias genéticas en el gen *SPRN* en los rumiantes pueden, probablemente, contribuir a la susceptibilidad o patogénesis del scrapie en ovinos y caprinos, de la EEB en el ganado bovino y la enfermedad crónica caquetizante en ciervos.

2.5.1 Gen *PRNP*

El gen *PRNP* está altamente conservado en los mamíferos y existen otros genes parálogos descritos en otras especies como aves (Gabriel *et al.*, 1992), anfibios (Strumbo *et al.*, 2001), reptiles (Simonic *et al.*, 2000) y peces (Cotto *et al.*, 2005). El gen se encuentra en el cromosoma 13 en rumiantes, 2 en ratones y 20 en humanos (Sparkes *et al.*, 1986), y su longitud es variable dependiendo de la especie: 31.412 pares de bases (pb) en la oveja (U67922), 26.943 pb en la cabra (EU870890), 78.056 pb en la vaca (AJ298878) y 65.476 pb en el ciervo mula (AY330343).

Figura 4: Representación de la estructura del gen *PRNP* en la especie humana, en el modelo murino y en rumiantes.



Adaptado: Allais-Bonnet y Pailhoux (2014)

En la mayoría de las especies de mamíferos el gen *PRNP* contiene dos exones, con la excepción de ovejas, ratones y ratas, que poseen tres. En todos los casos la proteína

PrP^C está codificada por el exón terminal en el que se encuentra todo el marco de lectura abierto (ORF- *Open Reading Frame*), y los otros exones albergan secuencias no traducidas tales como la región promotora y los sitios de terminación. En la región promotora, el gen *PRNP* se caracteriza por la ausencia de una caja TATA (Basler *et al.*, 1986), que se sustituye por una secuencia reguladora de repeticiones rica en GC, con posibles sitios de unión para muchos factores de transcripción tales como Sp1, AP1 y AP2 (McKnight y Tjian, 1986; Westaway *et al.*, 1994; Saeki *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 1997; Mahal *et al.*, 2001).

El gen *PRNP* codifica la proteína prion (PrP), una glicoproteína de membrana que posee entre 230 y 256 aminoácidos, y que presenta una elevada homología entre las distintas especies, como por ejemplo entre las especies bovina y ovina, en las que un 94% de la secuencia nucleotídica es idéntica. Y en el caso del gen *PRNP* humano, éste presenta una homología del 65,4% con el ovino y del 66,7% en el bovino.

2.5.1.1 Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie ovina

En la especie ovina se ha estudiado ampliamente la influencia que distintas mutaciones en el gen *PRNP* tienen sobre la susceptibilidad o resistencia al scrapie, describiéndose en los ovinos al menos 41 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico en 27 codones distintos.

Las variaciones más importantes descritas están presentes en los codones 136, 154 y 171, dando lugar a cinco haplotipos distintos: VRQ, ARQ, AHQ, ARH y ARR, siendo el haplotipo ARQ considerado el ancestral (“wild type”). Los genotipos VRQ / VRQ, VRQ / ARQ y ARQ / ARQ se han asociado con la susceptibilidad a la enfermedad, mientras que el genotipo ARR / ARR se ha asociado con el mayor nivel de resistencia a la misma (Belt *et al.*, 1995; Bossers *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1997).

En acuerdo con el “British National Scrapie Plan”, la Comisión Europea ha agrupado los genotipos del gen *PRNP* ovino en cinco niveles de riesgo:

- R1: genotipo más resistente, ARR/ARR.
- R2: genotipos con alta resistencia, ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ.
- R3: genotipos con baja resistencia: ARQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, AHQ/ARH, y AHQ/ARQ.
- R4: genotipo susceptible, ARR/VRQ.

- R5: genotipos con alta susceptibilidad: ARQ/VRQ, ARH/VRQ, AHQ/VRQ, y VRQ/VRQ.

De conformidad con la Decisión 2003/100 / CE de la Unión Europea, cada Estado miembro ha introducido en las poblaciones de ovejas un programa de selección genética a las EET, con objetivo de aumentar la frecuencia del alelo ARR.

2.5.1.2 Polimorfismos del gen *PRNP* en cabras

Estudios realizados en todo el mundo demuestran que la especie caprina también presenta una gran variabilidad genética para el gen *PRNP*, habiéndose descrito más de 40 polimorfismos con cambio aminoácido y 17 mutaciones silentes (Tabla 2).

Diversos estudios, en los que han utilizado cabras infectadas con scrapie de forma natural y experimental, han demostrado que determinados polimorfismos en el gen *PRNP* están asociados con las EET y pueden modular la susceptibilidad o resistencia de sus portadores. Algunos estudios describen que la presencia de metionina en el codón 142 puede representar un menor riesgo del individuo a desarrollar la enfermedad (Goldmann *et al.*, 2011), además, en animales con dicho polimorfismo se han observado periodos de incubación más largos en determinadas EET experimentales (Goldmann *et al.*, 1996). Otro estudio realizado en un rebaño de cabras con alta incidencia de scrapie, demostró que los animales portadores de la mutación I142M presentaban mayor cantidad de PrP^{Sc} en el encéfalo cuando eran comparados con los animales de genotipo ancestral, aunque el SLR estaba muy poco afectado (Gonzalez *et al.*, 2010).

También se ha descrito que las cabras portadoras del alelo con tres repeticiones de octapéptidos y a su vez de la mutación W102G, han demostrado una baja susceptibilidad al scrapie (Goldmann *et al.*, 1998). En algunas razas de cabras griegas se ha identificado que las variaciones R143 y H154 pueden ofrecer alguna protección frente al scrapie natural (Billinis *et al.*, 2002). Del mismo modo, una baja susceptibilidad al scrapie se ha relacionado con las variaciones R154H y R211Q (Barillet *et al.*, 2009, Bouzalas *et al.*, 2010), aunque el polimorfismo R154H se considera como un factor de riesgo para el scrapie atípico (Colussi *et al.*, 2008).

Tabla 2: Polimorfismos descritos en la especie caprina.

Codón	Mutación	Referencia
18	W → R	(Vaccari <i>et al.</i> , 2009)
21	V → A	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
22	G → C	(Hussain <i>et al.</i> , 2011)
23	L → P	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
37	G → V	(Agrimi <i>et al.</i> , 2003)
39	S → R	(Babar <i>et al.</i> , 2009)
49	G → S	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
63	P → L	(Hussain <i>et al.</i> , 2011)
74	G → D	(Acin <i>et al.</i> , 2013)
101	Q → R	(Serrano <i>et al.</i> , 2009; Vaccari <i>et al.</i> , 2009)
102	W → G	(Goldmann <i>et al.</i> , 1998)
110	T → P	(Agrimi <i>et al.</i> , 2003)
112	M → T	(Acin <i>et al.</i> , 2013)
127	G → S	(Zhang <i>et al.</i> , 2004; Kurosaki <i>et al.</i> , 2005)
133	L → Q	(Acutis <i>et al.</i> , 2006)
137	M → I	(Acutis <i>et al.</i> , 2006)
139	R → S	(Acin <i>et al.</i> , 2013)
139	R → S	(Serrano <i>et al.</i> , 2009)
141	L → F	(Acin <i>et al.</i> , 2013)
142	I → M	(Goldmann <i>et al.</i> , 2006)
142	I → T	(Acutis <i>et al.</i> , 2008)
143	H → R	(Goldmann <i>et al.</i> , 1996)
145	G → D	(Serrano <i>et al.</i> , 2009)
146	N → D	(Papasavva-Stylianou <i>et al.</i> , 2007)
146	N → S	(Zhang <i>et al.</i> , 2004; Kurosaki <i>et al.</i> , 2005)
151	R → H	(Papasavva-Stylianou <i>et al.</i> , 2007)
154	R → H	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
163	Q → Stop	(Papasavva-Stylianou <i>et al.</i> , 2011)
168	P → Q	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
171	Q → R	(Bouzas <i>et al.</i> , 2011)
185	I → F	(Babar <i>et al.</i> , 2009)
194	T → P	(Acutis <i>et al.</i> , 2008)
201	F → L	(Goldmann <i>et al.</i> , 2011)
208	I → T	(Papasavva-Stylianou <i>et al.</i> , 2011)
211	R → Q	(Wopfner <i>et al.</i> , 1999)
211	R → G	(Zhou <i>et al.</i> , 2008)
215	Q → R	(Acin <i>et al.</i> , 2013)
218	I → L	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
219	T → I	(Zhou <i>et al.</i> , 2008)
220	Q → H	(Billinis <i>et al.</i> , 2002)
222	Q → K	(Agrimi <i>et al.</i> , 2003)
232	G → W	(Vaccari <i>et al.</i> , 2009)
240	S → P	(Goldmann <i>et al.</i> , 1996)

Otros polimorfismos como el N146D y N146S se han relacionado con la resistencia al scrapie en cabras de Chipre (Papasavva-Stylianou *et al.*, 2011). En Italia en un estudio de 177 cabras de seis brotes de scrapie se encontró una posible asociación con la resistencia a la enfermedad en animales que presentaban la mutación glutamina (Q) a lisina (K) en el codón 222 (Acutis *et al.*, 2006). Resultados similares fueron descritos en otro rebaño de cabras afectadas por scrapie en Italia (Vaccari *et al.*, 2006) y en Francia (Barillet *et al.*, 2009). Además, otros estudios experimentales con aislamientos de scrapie (Acutis *et al.*, 2012; Corbière *et al.*, 2013; Aguilar-Calvo *et al.*, 2014; Lacroux *et al.*, 2014) refuerzan la hipótesis de que Q222K es un polimorfismo protector.

Recientemente, en un estudio italiano se ha identificado la presencia del alelo D145 como posible candidato a conferir resistencia, pero teniendo en cuenta que es un estudio preliminar y realizado en una única raza, no se puede concluir su verdadera participación en la resistencia a la enfermedad (Maestrale *et al.*, 2015).

El alelo S127 ha demostrado cierta protección frente el scrapie clásico, tanto en estudios de casos naturales como experimentales (Goldmann *et al.*, 2011; Dassanayake *et al.*, 2015). La presencia de S127 retrasa la aparición de signos clínicos, pero no el depósito de la proteína prion en la fase final de la enfermedad.

En un trabajo realizado en cabras portadoras de los polimorfismos I142M, R154H, R211Q y Q222K, infectadas con scrapie natural por vía oral e intracerebral se confirmó que los polimorfismos R154H y R211Q suponen un aumento considerable de la resistencia a la enfermedad por vía oral, que es incluso mayor que la proporcionada por el polimorfismo I142M. En el citado estudio, los individuos heterocigotos Q222K y una pequeña proporción de cabras homocigóticas K222 también desarrollaron la enfermedad, pero con períodos de incubación que fueron 4 a 5 veces más largos que los de los animales Q222Q. Estos resultados apoyan la opinión de que la variante K222 proporciona un efecto intenso pero no absolutamente protector frente el scrapie clásico (Lacroux *et al.*, 2014).

Recientemente, un estudio de ratones transgénicos caprinos Q222 (genotipo ancestral) y K222 inoculadas intracerebralmente con distintos aislados de EET demostró que los ratones que expresan el alelo Q222 fueron completamente susceptibles a la infección con todos los aislados. Los animales heterocigotos Q222K, demostraron mayor resistencia a los aislados de scrapie, mientras que los ratones transgénicos K222 presentaron resistencia a todos los aislamientos de EEB bovina y scrapie, pero no a los aislamientos de EEB caprina. (Aguilar-Calvo *et al.*, 2014).

2.5.1.3 Polimorfismos del gen *PRNP* en bóvidos

En la especie bovina los polimorfismos del gen *PRNP* descritos (W84R, G100S, K113R, V115M, H143R, S146N y N177S) tienen poco o ningún efecto sobre la susceptibilidad o resistencia a la encefalopatía espongiforme bovina. Sin embargo, determinados estudios asocian ciertos polimorfismos en la región promotora del gen con la susceptibilidad a la EEB (Sander *et al.*, 2004). Una hipótesis planteada es que los polimorfismos de la región promotora del gen *PRNP* bovino provocan cambios en la expresión del gen que podrían ser responsables de las diferencias en el periodo de incubación y / o en la susceptibilidad a la EEB. Parece existir una asociación entre la resistencia frente a la EEB y la inserción o delección de 12 y 23 pares de bases en la región promotora del gen *PRNP* (Sander *et al.*, 2004; Juling *et al.*, 2006), de manera que aquellos animales que presentan alelos de delección en homocigosis de 23 pb y 12 pb poseen un mayor riesgo de desarrollar EEB (Haase *et al.*, 2007).

2.5.1.4 Polimorfismos del gen *PRNP* en ciervos

Varios estudios, realizados sobre todo en América del Norte, también han demostrado una asociación entre polimorfismos del gen *PRNP* y la modulación de la enfermedad crónica caqueutizante. El primer polimorfismo descrito como protector a la enfermedad fue el M132L, en el alce de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*), en el que la homocigosidad metionina en este mismo codón estaría asociada con la susceptibilidad (O'Rourke *et al.*, 1999). Posteriormente, mediante infección experimental de alces por vía oral (Hamir *et al.*, 2006) e inoculación de ratones transgénicos que expresaban los polimorfismos M132 y L132, también se observó el efecto protector de esas variaciones (Green *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio con animales de vida libre de la misma especie infectados de forma natural con la ECC no demostró asociación entre los distintos polimorfismos en el codón 132 y la susceptibilidad a la enfermedad (Perucchini *et al.*, 2008).

En el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*) en un estudio de infección natural, los animales homocigotos serina en el codón 225 mostraron tener una mayor susceptibilidad a infectarse con la ECC, que los animales S/F o FF (Jewell *et al.*, 2005). No obstante, el genotipo S225F parece reducir la susceptibilidad o afectar el curso de la enfermedad, pero no confiere resistencia completa.

En el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) se han detectado polimorfismos en los codones 65 (G → E), 95 (Q → H), 96 (G → S) y 116 (A → G) (Heaton *et al.*, 2003; O'Rourke *et al.*, 2004), y estos últimos tres parecen estar asociados con una menor susceptibilidad a la EEC (Johnson *et al.*, 2003; O'Rourke *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006). En un estudio realizado en Nebraska, utilizando ciervos cautivos, los individuos con presencia de serina en el codón 96 presentaron una menor susceptibilidad a la ECC que los demás (O'Rourke *et al.*, 2004). De forma similar, se observó que ciervos de vida libre, en Wisconsin, portadores de histidina en el codón 95 y serina en el codón 96 presentaban menor susceptibilidad a la enfermedad, aunque se detectó un animal G96S/S96S positivo, lo que demostró que serina en el codón 96 tampoco confiere total resistencia (Johnson *et al.*, 2006).

Se han descrito otros polimorfismos en especies de cérvidos no americanas, como en un estudio realizado en Escandinavia que identificó la presencia de los polimorfismos K109Q en el alce europeo (*Alces alces*), N176D y S225Y en el reno (*Rangifer t. tarandus*), y Q226E en el gamo (*Dama dama*) (Wik *et al.*, 2012). Y en estudios realizados con ciervos sika (*Cervus nippon*) alojados en régimen de cautividad en China y Corea, se observaron variaciones de aminoácidos en los codones 100 (S → G) y 226 (E → Q) (Meng *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2007).

2.5.1.5 Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie humana

En la especie humana el gen *PRNP* se localiza en el cromosoma 20 y codifica para una proteína de 253 aminoácidos. Actualmente se han descrito 25 mutaciones en el gen *PRNP* humano, pero no todas están ligadas a las EET. Las mutaciones en los codones 102, 117, 178, 198 y 200 han sido identificadas en formas familiares de EET humanas (Doh-ura *et al.*, 1989; Goldgaber *et al.*, 1989; Hsiao *et al.*, 1989). La mutación que supone un cambio de prolina por leucina en el codón 102 es suficiente para causar una forma de GSS, mientras que la causa más frecuente de ECJ familiar es la mutación puntual en el codón 200, la cual aparece en más del 70% de las familias con ECJ hereditaria del mundo. También se ha demostrado que el polimorfismo M/V en el codón 129 parece ser un factor clave en la susceptibilidad a las EET humanas, además de actuar como un modificador del fenotipo de la enfermedad (Collinge *et al.*, 1991; Doh-ura *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 2017). Los polimorfismos en el codón 129 varían mucho entre los asiáticos orientales y los caucásicos. Un abrumador porcentaje de asiáticos orientales (92% a 94%) son

homocigotos metionina (M129M), y un porcentaje mucho más bajo de caucásicos tiene este polimorfismo (32% a 45%) (Jeong y Kim, 2014). Todos los casos de vCJD con síntomas clínicos y análisis genético en todo el mundo son homocigotos para M129M. Además, el polimorfismo del codón 129 del gen *PRNP* tiene efectos obvios sobre las características clínicas, neuropatológicas y patogénicas de la enfermedad priónica (MacDonald *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 2000).

2.5.2 Gen *SPRN*

La primera descripción del gen *SPRN* fue en 2003, cuando a partir de una secuencia de ADN del pez cebra se identificaron proteínas homólogas en peces y mamíferos, y se empezó a caracterizar el gen y la proteína codificada mediante las informaciones ya existentes. Se observaron similitudes entre esta proteína y la proteína prión (PrP), así como su alta expresión en encéfalo, lo que hizo pensar que la misma podía estar relacionada funcionalmente con la PrP y quizás ser importante para entender la susceptibilidad a las enfermedades priónicas (Premzl *et al.*, 2003).

El gen *SPRN* está altamente conservado entre las distintas especies y codifica una proteína de 130-150 aminoácidos llamada Shadoo, que comparte varias características estructurales y bioquímicas con la PrP. El gen se encuentra en el cromosoma 26 en rumiantes, 7 en ratones y 10 en humanos, y está compuesto por dos exones, la parte proximal de 1 a 122 pb comprende el exón 1 y de 123 a 908 pb, comprende el exón 2. El tamaño del intrón es de 4233 pb y el marco de lectura abierto completo (formado por 399 pb,) está codificado por el exón 2 (Figura5) (Premzl *et al.*, 2003).

Figura 5: Representación de la estructura del gen *SPRN* en la especie humana, en el modelo murino y en rumiantes.



Adaptado: Allais-Bonnet y Pailhoux (2014)

La variación de la secuencia en el gen *SPRN* puede tener un efecto sobre la susceptibilidad al scrapie, ya que se cree que Sho está implicada en la patogénesis de las EET y muestra niveles reducidos durante las infecciones por priones. Un estudio de Beck y colaboradores (2008) demostró la asociación del gen *SPRN* con la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob esporádica y con la variante de ECJ. Se observó que una mutación en el gen podía reducir la expresión de Sho, lo que parecía aumentar el riesgo de la vECJ y que otra mutación de codificación podía ser también un factor de riesgo para la ECJ esporádica. Esta afirmación es contraria a lo que sucede con el gen *PRNP* en el que la reducción de la expresión tiene el efecto opuesto sobre el scrapie (Manson y Tuzi, 2001).

En las ovejas, la inserción / deleción de dos residuos de alanina en la región hidrófoba de *SPRN* homóloga de la PrP, se ha asociado con susceptibilidad al scrapie clásico (Lampo *et al.*, 2010). En cabras, sin embargo, los datos sobre la variabilidad del *SPRN* son limitados. Un estudio de Peletto y colaboradores (2012) demostró una asociación entre el gen *SPRN* y el scrapie caprino. En este caso, la inserción / deleción identificada (602_606insCTCCC) en el 3`UTR se considera que puede servir como un objetivo genético distinto para predecir el riesgo de la enfermedad del scrapie en cabras.

2.6 DIAGNÓSTICO DE LAS EET

El diagnóstico precoz es fundamental para aumentar la posibilidad de control de las enfermedades, pero en el diagnóstico de las EET desafortunadamente los métodos *in vivo* no poseen una alta sensibilidad. En el caso del diagnóstico clínico, en ocasiones puede resultar difícil ya que el cuadro clínico que el individuo presenta es difuso, no existiendo ningún signo único, sino que, por el contrario, una gran cantidad de signos compartidos con otras patologías que afectan al SNC. Además, en el diagnóstico diferencial en los rumiantes deben de tenerse en cuenta todos los tipos de enfermedades neurológicas que afectan a estas especies, incluidas las encefalitis infecciosas, los trastornos metabólicos (cetosis, hipomagnesemia), las toxicosis, las neoplasias y los traumatismos (OIE, 2016).

En el caso concreto del scrapie, el diagnóstico *in vivo* se realiza mediante la identificación de agregados de folículos linfoides en el extremo distal de la mucosa rectal (Aleksandersen *et al.*, 1991), y la posterior detección de la PrP^{Sc} (Gonzalez *et al.*, 2005), o en otros tejidos como el tercer párpado (Vargas *et al.*, 2006) o las amígdalas palatinas

(van Keulen *et al.*, 1996). Sin embargo, estas pruebas presentan una baja sensibilidad, dando lugar a falsos negativos, porque la distribución del prión a través del sistema linfoide depende de la resistencia genética del animal, de la exposición y de la cepa priónica.

2.6.1 Examen histopatológico

Inicialmente el diagnóstico de las EET se realizaba mediante la técnica histológica y tinción de hematoxilina-eosina, con la cual se pueden observar lesiones microscópicas características en el SNC (Wells y Wilesmith, 1995), principalmente espongiosis que suele acompañarse de gliosis, degeneración y pérdida neuronal, y en determinados casos, amiloidosis (Wells y McGill, 1992). El perfil lesional se llevó a cabo por vez primera en un estudio de la biología del scrapie en el modelo murino experimental (Fraser y Dickinson, 1968). Posteriormente se adaptó para la caracterización de EET naturales, inicialmente para BSE (Simmons *et al.*, 1996), y más tarde para scrapie en ovejas (Begara-McGorum *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002) y cabras (Caramelli *et al.*, 2001). Estas aplicaciones previas de perfiles lesionales se utilizaron para abordar diversas hipótesis con respecto a las similitudes o características fenotípicas comunes dentro de conjuntos de casos examinados. No obstante, debido a la dificultad e incluso en ocasiones imposibilidad de realizar el diagnóstico en los casos en los que los animales presentan lesiones mínimas o insuficientes (Begara-McGorum *et al.*, 2000), surgió la necesidad de utilizar otras técnicas de diagnóstico.

2.6.2 Técnicas de diagnóstico rápido

Hasta el año 2001 el diagnóstico de las EET dependía de la detección de “animales clínicamente sospechosos” y su posterior confirmación laboratorial con las técnicas reconocidas por la OIE: examen histopatológico, detección de PrP^{Sc} mediante técnicas IHQ o de WB y la observación de las fibrillas asociadas a scrapie (SAF) mediante microscopía electrónica. Con la puesta en marcha de la vigilancia activa en España (RD 3454/2000), se introdujeron los test rápidos de diagnóstico que permitieron diagnosticar un elevado número de animales en un tiempo razonablemente corto. Estos tests se basan en la detección de la PrP^{Sc} mediante la utilización de anticuerpos específicos, los cuales

son capaces de diferenciar distintas conformaciones, uniéndose específicamente a la PrP^{Sc} y no a la PrP^C o bien por las características de resistencia de la PrP^{Sc} a las proteasas.

Actualmente existen en el mercado 7 test autorizados para el diagnóstico de las EET en las especies ovina y caprina (Bio-Rad TeSeE test, Bio-Rad TeSeE Sheep/Goat rapid test, Enfer TSE Kit version 2.0, Enfer TSE version 3, IDEXX HerdChek BSEScrapie Antigen Test Kit, EIA, Prionics-Check Western Small Ruminant test, Prionics Check LIA Small Ruminants) y nueve para el diagnóstico de la EEB (Prionics-Check Western test, Enfer test y Enfer TSE Kit version 2.0, Enfer TSE version 3, Bio-Rad TeSeE test, Prionics-Check LIA test, IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit, EIA, Prionics Check PrioSTRIP, Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit, Roche Applied Science PrionScreen).

2.6.3 Inmunohistoquímica

Independientemente del diagnóstico *in vivo* o de las técnicas rápidas, siempre es necesaria la confirmación de las muestras positivas. La técnica de elección para diagnóstico de las EET es la inmunohistoquímica, una técnica de alta sensibilidad y especificidad, siendo considerada el método de diagnóstico de referencia por la OIE. Consiste en la detección microscópica de inmunotinción de la PrP^{Sc}, y también revela su patrón y distribución en el tejido. Para obtener una buena sensibilidad y especificidad de la técnica, es importante el protocolo de fijación del tejido y los procedimientos empleados para desenmascarar los antígeno y para eliminar la proteína prion celular.

La IHQ también se utiliza como método para diferenciar distintas cepas, ya que la acumulación de PrP^{Sc} en el encéfalo da lugar a una serie de patrones o tipos de depósito característicos y diferenciables, cuya magnitud se puede valorar en diferentes áreas neuroanatómicas con el fin de elaborar un perfil inmunohistoquímico.

2.6.4 Western Blot

El diagnóstico mediante Western Blot también es un método fiable, y que además, permite detectar la proteína patológica en tejido fresco o congelado, en función de su resistencia a la digestión por proteinasa K (pK), su peso molecular y su reacción frente a anticuerpos específicos. En esta técnica, la muestra es sometida a un proceso de digestión, en el cual la PrP^C se degrada por completo, mientras que en la PrP^{Sc} el extremo N-terminal

deja una fracción resistente a la pK de 27 a 30 kDa. Posteriormente se aplica una electroforesis en gel de poliacrilamida, de forma que la PrP^{Sc} migra y se separa en función del peso molecular presentando un patrón típico de tres bandas: diglicosilada, monoglicosilada y no-glicosilada. Luego se realiza la transferencia a una membrana y por último se lleva a cabo una reacción antígeno anticuerpo, para poder visualizar esas distintas bandas. Esta técnica presenta una elevada sensibilidad y por tanto una incidencia muy baja de falsos negativos. También es un método utilizado para la diferenciación de cepas, de manera que el número de bandas detectadas, la altura e intensidad de cada una, e incluso su afinidad por determinados anticuerpos, constituye un patrón de glicosilación particular de cada agente causal (Collinge *et al.*, 1996; Somerville *et al.*, 1997).

2.6.5 Programa de vigilancia

La posibilidad de que el prion saltara la barrera de especie, como quedó demostrado por la transmisión del agente causal de la EEB a los humanos dando origen a la vECJ (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997), hizo que se implantasen numerosas medidas legislativas en la UE dirigidas a erradicar la EEB y evitar su transmisión a otras especies animales y al hombre. Aunque no hay evidencias de que el scrapie suponga un riesgo para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003), se ha demostrado que ovinos y caprinos pueden infectarse de manera experimental y natural por vía oral con el agente de la EEB (Foster *et al.*, 1993; Eloit *et al.*, 2005). Además, la imposibilidad de diferenciar clínica y anatomopatológicamente el scrapie de la EEB en pequeños rumiantes, determinó que las principales medidas adoptadas para la vigilancia y control de la EEB, se aplicasen también al scrapie. Por ello, ante el riesgo que supuso la entrada del agente causal de la EEB en la cadena alimentaria, se establecieron programas de vigilancia de ambas enfermedades, EEB y scrapie, con el objetivo principal de detectar los animales infectados y eliminarlos de la cadena alimentaria como medida para proteger la salud pública y la seguridad de los alimentos (Real Decreto 617/2007 y según las modificaciones introducidas en el Real decreto 526/2014).

Los estudios sobre la patogenia de la EEB indican que la infectividad se localiza principalmente en el SNC y, en el caso del scrapie, también en el SLR. Los tejidos que presentan una mayor infectividad se definieron como materiales específicos de riesgo (MER) y la medida más importante para la protección de los consumidores fue la exclusión de los mismos de la cadena alimentaria humana (Reglamento (CE) 999/2001 y

sus modificaciones; Bradley, 2002; Dormont, 2002). En el caso del ovino y caprino, se clasifican como MER el cráneo (incluidos el encéfalo y los ojos), las amígdalas y la médula espinal de animales de más de 12 meses de edad o en cuya encía haya hecho erupción un incisivo definitivo, y el bazo y el íleon de todos los animales. En el caso del bovino, el cráneo (incluidos el cerebro y los ojos), las amígdalas y la médula espinal de los bovinos de más de doce meses, así como los intestinos, desde el duodeno hasta el recto, de los bovinos de todas las edades; toda la cabeza (excluida la lengua), incluidos el cerebro, los ojos, los ganglios del trigémino y las amígdalas; el timo; el bazo y la médula espinal de los bovinos de más de 6 meses, así como los intestinos, desde el duodeno hasta el recto, de los bovinos de todas las edades; la columna vertebral, incluidos los ganglios de la raíz dorsal, de los bovinos de más de 30 meses.

A nivel de la UE, el seguimiento de las EET está regulado por el Reglamento comunitario (CE) 999/2001 y sus posteriores modificaciones, que recogen todas las medidas de obligado cumplimiento en el territorio de la Unión en diversos campos. La primera medida tomada en la UE para prevenir, controlar y erradicar las EET fue el control de las harinas de carne y hueso en el pienso en el año 1994.

En España, en 1997 se inició un programa de vigilancia pasiva que se basó en la detección y declaración obligatoria de los animales clínicamente sospechosos de padecer una EET. En el año 2000, tras la declaración del primer caso de EEB en España, se publicó el RD 3454/2000, por el que se establecía un Programa integral coordinado de vigilancia activa y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales, que incluyó, como actuaciones concretas, los programas de vigilancia, el control de las materias empleadas en la alimentación de animales, la inspección de establecimientos de transformación de subproductos y animales muertos y el control de los materiales especificados de riesgo (MER). El programa de vigilancia activa se basó en la búsqueda activa de la enfermedad, mediante un muestreo obligatorio de vacunos, sacrificados en los mataderos y de campañas de saneamiento de más de 24 meses de edad en un principio, y de los animales muertos en las explotaciones de vacunos. Asimismo se incorporó el uso de los test rápidos en el diagnóstico de la enfermedad bovina. Un programa similar se estableció para los pequeños rumiantes, aunque con la diferencia fundamental de que la vigilancia activa consistió en un muestreo aleatorio y representativo.

Durante el año 2005 debido a la disponibilidad de test diagnósticos discriminatorios que permitían diferenciar entre EEB y scrapie (EFSA 2005), y tras la confirmación del primer caso de EEB en un animal de la especie caprina, se modificó la

normativa comunitaria con el objeto de poder discriminar entre scrapie y EEB en todos los casos confirmados de una EET en pequeños rumiantes. El Reglamento (CE) 36/2005 establece que deben realizarse estas pruebas discriminatorias de forma rutinaria en todos los casos confirmados de scrapie.

Las medidas de erradicación se aplican según lo dispuesto en el Anexo VII del Reglamento (CE) 999/2001 y según las modificaciones introducidas en el Reglamento (CE) 103/2009. Dentro de ellas están: destrucción del animal infectado, sacrificio y destrucción de animales expuestos, desinfección apropiada de instalaciones, reintroducción de animales nuevos y restricciones al movimiento. Tras la confirmación de un caso de scrapie, todas las partes del cuerpo del animal infectado debían ser destruidas. Si tras las pruebas laboratoriales, los resultados no permiten descartar la presencia de EEB, se destruirán también la leche y productos lácteos presentes en la explotación desde la fecha en que se detectaron los animales positivos. En 2003, para la especie ovina, se aplicó el Reglamento (CE) 260/2003 que estableció la realización de pruebas genéticas de los animales para determinar individualmente si el animal es portador del alelo ARR, considerado como "resistente" o si es portador, por ejemplo, del alelo VRQ siendo considerado como "sensible". De forma que únicamente se estableció como obligatorio el sacrificio de los animales de los genotipos "sensibles". Además, la repoblación del rebaño se debía realizar con animales "resistentes", es decir, en rebaños en los que se había detectado un foco de scrapie sólo se podrían introducir ovinos machos del genotipo ARR/ARR y hembras portadoras de al menos un alelo ARR y ningún VRQ.

2.7 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS

Al igual que los agentes infecciosos convencionales, los priones presentan una gran variedad de cepas, que pueden causar distintos periodos de incubación, signos clínicos y perfiles lesionales y de depósito de la PrP^{Sc}. La primera evidencia de la existencia de diferentes cepas priónicas se identificó en cabras inoculadas con un grupo de encéfalos de ovejas infectados con scrapie. La transmisión del scrapie produjo dos enfermedades clínicas distintas: "scratching (rascarse)" y "drowsy (adormecido)" (Pattison *et al.*, 1959; Pattison y Millson, 1961).

La aparición de nuevas cepas de priones ocurre cuando un prión propagado no mantiene las mismas características bioquímicas y patogénicas que la cepa original. Este

fenómeno puede ocurrir durante la transmisión cruzada de especies o dentro de una sola especie (Falsig *et al.*, 2008). En el primer caso, la secuencia de PrP^C del huésped es diferente de la del donante (agente prion) y, debido a la barrera de especie, el proceso de conversión puede conducir a una cepa diferente (Collinge *et al.*, 1996). En el segundo caso, el gen *PRNP* es idéntico en el donante y en el huésped, lo que sugiere que otros mecanismos tales como cofactores o el entorno celular del huésped o polimorfismos de la secuencia PrP^C pueden estar implicados en la selección de cepas. Para la identificación y caracterización de las diferentes cepas responsables de las EET, se debe tener en cuenta que, al carecer el agente etiológico de ácido nucleico, las cepas deben diferenciarse por sus propiedades fenotípicas; de forma que podrían definirse como aquellas variantes priónicas infecciosas que, al transmitirse a hospedadores idénticos, dan lugar a distintos fenotipos de la enfermedad.

Para caracterizar las cepas priónicas se utilizan una serie de parámetros diferentes:

- Propiedades biológicas: las cepas priónicas producen fenotipos específicos para las distintas enfermedades, que pueden identificarse por sus periodos de incubación, signos clínicos y alteraciones histopatológicas (perfil lesional), la distribución de la PrP^{Sc} y sus tropismos tisulares y celulares.

- Propiedades bioquímicas: cada cepa priónica se asocia con un grupo específico de características bioquímicas, siendo las principales para la diferenciación del prion las siguientes: la estabilidad frente a los agentes desnaturalizantes, los patrones de glicosilación, la movilidad electroforética tras la digestión con PK, y la resistencia a la degradación proteolítica. También se ha descrito que las cepas pueden diferir en su afinidad de unión por el cobre (Wadsworth *et al.*, 1999).

- Propiedades de conformación: las distintas cepas pueden mostrar patrones similares de resistencia a la proteasa, pero pueden distinguirse por sus conformaciones. Las diferencias en la conformación pueden revelarse mediante técnicas de sedimentación (Bessen y Marsh, 1992), de dispersión de la luz (Scheibel y Lindquist, 2001), de microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica para ensamblaje (Serio *et al.*, 2000), mediante estudios de cambio estructural, por dicroísmo circular (Safar *et al.*, 1998) y por tinción vinculante (Nilsson, 2004, Sigurdson *et al.*, 2006, Sigurdson *et al.*, 2007), y finalmente mediante el mapeo de sitios de unión por inmunoensayo dependiente de la conformación (CDI) (Zou *et al.*, 2003).

2.7.1 PERFIL LESIONAL DE VACUOLIZACIÓN

La lesión histopatológica más característica en las EET es la degeneración vacuolar del neuropilo de la sustancia gris, la cual se distribuye de forma específica en determinadas áreas del encéfalo según la cepa causante de la enfermedad y la raza del hospedador (Bruce y Fraser, 1991; Wood *et al.*, 1997). La comparación de los perfiles de vacuolización por sí solos no puede conducir a afirmaciones definitivas sobre la cepa infectante ya que otros aspectos del fenotipo de la enfermedad también deben ser tomados en consideración. Para realizar el perfil histopatológico se valora de forma subjetiva la vacuolización de una serie de áreas presentes en diferentes secciones del encéfalo del animal, las cuales son: médula oblongada, cerebelo, puente, mesencéfalo, diencéfalo, ganglios basales y corteza cerebral frontal. Esta valoración se realiza dando un valor a cada área entre 0 (ausencia de vacuolización) a 3 (vacuolización extensa).

2.7.2 PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

Los perfiles inmunohistoquímicos, se realizan mediante el análisis de los depósitos de PrP^{Sc} en el SNC y se pueden utilizar como herramienta para diferenciar las distintas cepas priónicas. Se describen, en general, 14 tipos distintos de depósito de PrP^{Sc} en 24 áreas, clasificándolos de manera subjetiva en grados de 0 (ausente) a 3 (severo) (Gonzalez *et al.*, 2014): Los 14 tipos definidos son:

- Intraneuronal: depósito de PrP^{Sc} que se encuentra en el pericarion de las neuronas.
- Intra-astrocítico: depósito de tipo granular localizado alrededor del núcleo de los astrocitos.
- Intramicroglial: grandes gránulos que aparecen alrededor del núcleo de células de la microglía.
- Particulado fino: punteado fino que se encuentra en el neuropilo.
- Amorfo asociado a glía: punteado grueso que se encuentra en el neuropilo.
- Perineuronal: el depósito se encuentra alrededor de las neuronas.
- Lineal: depósito de PrP^{Sc} formando líneas más o menos continuas que parecen asociarse a axones neuronales.
- Estrellado: depósito radiado y ramificado que normalmente se centra en el núcleo de una célula de la glía.
- Subpial: agregados localizados debajo de la piamadre.

- Subependimal: agregados situados debajo de la capa de células endoteliales.
- Perivascular: acumulación de depósitos alrededor de vasos sanguíneos.
- Perivacuolar: acumulación de PrP^{Sc} alrededor de vacuolas presentes en la sustancia gris o de espacios vacíos en la sustancia blanca.
- Placas vasculares: agregados de PrP^{Sc} que se acumulan alrededor de un núcleo intensamente teñido asociado a un vaso sanguíneo.
- Placas no vasculares: similares a las anteriores, pero no asociadas a un vaso.

En el scrapie ovino, el marcaje intraneuronal con el anticuerpo P4 es siempre mayor que con los anticuerpos como: R145, R482, R486 y L42. No obstante, este efecto se invierte en animales infectados con EEB. Estas diferencias entre el marcaje intragial e intraneuronal del encéfalo de ovejas infectadas por la EEB y scrapie coinciden con la certeza de que la proteína prion de la encefalopatía espongiforme bovina es sintetizada o plegada de forma distinta que la del scrapie. Sólo el anticuerpo P4 da mayor marcaje intraneuronal en el SNC infectado con scrapie que en la infección con el agente de la EEB. Además, casos preclínicos de ovejas infectadas por EEB pueden distinguirse de casos de scrapie por la menor cantidad de marcaje de PrP^{Sc} que contienen las secuencias de aminoácidos péptidos 84–102 en células del SNC (Jeffrey *et al.*, 2001).

2.7.3 PATRÓN DE GLICOSILACIÓN

La técnica de western blot permite observar un patrón de glicosilación de tres bandas que representan las tres glicofomas en las que se encuentra presente la proteína: diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada. En el caso de las cepas naturales de scrapie ovino no se sabe mucho sobre los diferentes patrones de glicosilación, habiéndose conseguido identificar en hospedadores naturales únicamente tres cepas de las 20 que se han comprobado que existen tras transmisión al modelo murino: la SSBP/1 (Dickinson *et al.*, 1968), la CH1641 (Foster y Dickinson, 1988) y la cepa de scrapie atípico Nor98 (Benestad *et al.*, 2003).

En Noruega, en 1998 se describieron cinco casos de scrapie natural que al analizarse mediante la técnica de Western Blot se identificó una característica inusual, un glicoperfil de PrP^{Sc} con una banda fuertemente marcada en 12 kDa, distinta a la de otras cepas conocidas de scrapie y de la cepa de EEB. Además de que las ovejas afectadas tenían genotipos homocigoto AHQ/AHQ y heterocigoto AHQ/ARQ presentaban

vacuolización del neuropilo y depósitos de PrP^{Sc} en la corteza cerebral y cerebelosa. Estas características tan especiales hicieron sospechar de una nueva cepa de scrapie, que fue denominada como Nor98 (Benestad *et al.*, 2003).

En el caso de la EEB en la especie bovina, el estudio de los patrones de glicosilación ha permitido la identificación de dos cepas atípicas, además de la clásica: la tipo L y la tipo H. Se diferencian por el peso molecular y el grado de glicosilación. Así la cepa tipo L tiene un patrón de glicosilación que refleja un menor peso molecular y unas proporciones relativas de las tres glicofomas distintas a la EEB clásica (Casalone *et al.*, 2004); mientras que la cepa tipo H tiene un patrón de glicosilación similar al clásico, pero presenta un mayor peso molecular (Biacabe *et al.*, 2004).

La tipificación molecular de las cepas priónicas de casos naturales de scrapie no ha demostrado similitud con la EEB. Un estudio demostró que la banda no glicosilada en la EEB ovina presentaba un tamaño molecular menor que en el caso del scrapie ovino (Hill *et al.*, 1998). No obstante, hay referencias de que el aislamiento de scrapie CH1641 tiene un perfil molecular muy similar al de la EEB, pero difiere en sus características de transmisión a los ratones (Hope *et al.*, 1999). Posteriormente, se observó que mediante la aplicación de un protocolo que utiliza dos anticuerpos distintos (P4 y 6H4), el anticuerpo P4 presenta una alta afinidad en el caso del scrapie, pero no en el caso de la EEB (Stack *et al.*, 2002). Al parecer, el epítipo para este anticuerpo está próximo al extremo N-terminal de la proteína ovina, cercano al lugar de unión de la proteinasa K, y probablemente una porción importante de dicho epítipo se destruya parcial o totalmente en el caso de la EEB, reduciéndose así la posibilidad de unión del anticuerpo. Así, mediante la utilización de determinados protocolos, se establecieron diferencias entre ovinos infectados de EEB y con scrapie natural a partir del análisis de los perfiles de glicosilación, diferencias relativas al peso molecular y a la proporción de las glicofomas características según el agente causal (Nonno *et al.*, 2003).

ESTUDIO I

Efecto del genotipo del gen *PRNP* sobre la susceptibilidad a la Encefalopatía Espongiforme Bovina en la especie caprina.

3. ESTUDIO I: Efecto del genotipo del gen *PRNP* sobre la susceptibilidad a la Encefalopatía Espongiforme Bovina en la especie caprina.

3.1 INTRODUCCIÓN

El scrapie se detectó por primera vez hace más de dos siglos y desde entonces hasta hoy no se ha demostrado evidencia epidemiológica de su transmisión a la especie humana. No obstante, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), cuya primera detección en la especie bovina data de los años 80 (Wells *et al.*, 1987), se asoció diez años más tarde con una nueva forma de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) en humanos, asociada al consumo de productos contaminados con la proteína priónica de la EEB (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997).

Durante la epidemia de la encefalopatía espongiforme bovina, las ovejas y las cabras también estuvieron expuestas a las harinas de carne y de hueso contaminadas, lo que podría haber producido la transmisión de la enfermedad a estas especies (Baylis *et al.*, 2002). De esta forma, se demostró que los pequeños rumiantes se podían infectar experimentalmente con la EEB (Foster *et al.*, 1993; Houston *et al.*, 2003; Bellworthy *et al.*, 2005; Bellworthy *et al.*, 2008; Stack *et al.*, 2009), pero también, de forma natural, confirmándose el primer caso en Francia, mediante vigilancia activa, en una cabra (Eliot *et al.*, 2005).

Tras demostrarse que la EEB podía afectar a los pequeños rumiantes, la capacidad para distinguir el scrapie clásico y la encefalopatía espongiforme bovina se convirtió en un reto importante al poder evaluar los riesgos que podía conllevar tanto para la ganadería como para la salud pública. De igual modo, se trabajó activamente en adoptar medidas de prevención y en seleccionar animales resistentes a estas enfermedades. Diversos estudios demostraron que el gen *PRNP* ovino también influía en la patogenia de la enfermedad, afectando por ejemplo a la diseminación de la PrP^{Sc} en el sistema linforreticular al fenotipo de la enfermedad, particularmente en cuanto a la morfología y distribución de los agregados de PrP^{Sc} y al papel que también podría desempeñar la existencia de diferentes cepas productoras de scrapie.

La influencia del gen *PRNP* ha sido estudiada en otras especies, aunque con especial importancia en la especie caprina tras el diagnóstico de su infección natural con EEB. Un gran número de cabras europeas fueron genotipadas y se encontraron determinados polimorfismos, los cuales podrían ser útiles a la hora de elaborar un

programa de selección genética similar al del ovino. El análisis de este gen ha dado lugar a la descripción de más de 40 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico y de 17 mutaciones silentes (Serrano *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2009; Goldmann *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011; Papasavva-Stylianou *et al.*, 2011; Acin *et al.*, 2013). Además, diversos estudios en cabras infectadas natural y experimentalmente por scrapie, han demostrado la capacidad de determinados polimorfismos para modular la susceptibilidad o resistencia de sus portadores a padecer la enfermedad.

En el caso de la EEB, pocos estudios han abordado la resistencia genética en cabras, estando el polimorfismo I142M asociado a un ligero aumento del período de incubación en estudios experimentales (Goldmann *et al.*, 1996). Además, se han realizado experimentos de transmisión oral de EEB a cabras portadoras de las mutaciones R211Q y Q222K, revelando que, mientras el primer polimorfismo extiende el período de incubación, solo el alelo K222 parece tener un efecto protector después de la infección oral (Aguilar-Calvo *et al.*, 2015). Este hecho convierte al polimorfismo Q222K en uno de los principales candidatos para establecer un programa de mejora genética para erradicar las EET en cabras.

En este trabajo, se ha realizado un estudio con cabras de distintos genotipos para el codón 222: animales homocigotos glutamina (Q222Q) y homocigotos lisina (K222K); además de dos caprinos portadores de los polimorfismos Q222Q y Q222K y heterocigotos glicina/serina en el codón 127. Los caprinos fueron inoculados con EEB bovina, a excepción de los animales G127S, inoculados con EEB de segundo pase en cabra (Pitarch, 2016).

El objetivo principal de este trabajo se centra especialmente en evaluar el efecto protector o de susceptibilidad que los polimorfismos Q222Q y K222K ejercen sobre cabras inoculadas intracerebralmente con EEB bovina, así como valorar el efecto de la barrera entre especies al inocular los caprinos con una cepa bovina directamente. Además, ha figurado como un objetivo adicional valorar el efecto del genotipo G127S en cabras inoculadas con EEB caprina. También como objetivos del estudio se planteó el determinar la infectividad y distribución de la PrP^{Sc} en el SNC y los tejidos periféricos, con el fin de definir el riesgo de exposición del hombre al agente de la EEB por el consumo de lácteos y productos cárnicos. Por último, se ha realizado la caracterización del agente causal mediante las técnicas de inmunohistoquímica y Western-Blot con distintos anticuerpos y en diferentes sitios de reconocimiento de epítomos.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Material. Animales

Este estudio se realizó de acuerdo con la Política de Protección Animal española comprendida en el Real Decreto 53/2013, que cumple con la directiva europea 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales. El protocolo experimental se ha aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, permiso PI12 / 11.

En este trabajo se utilizaron ocho animales caprinos de raza alpina, tres hembras provenientes de Vitoria y cinco machos importados de Francia, con edades comprendidas entre los 2 y 5 años. Cinco de los animales fueron agrupados por su genotipo para el codón 222: un grupo consistió en tres animales homocigotos Glutamina Q222Q y el segundo grupo lo conformaron los dos animales homocigotos Lisina K222K. Los demás animales, dos homocigotos Glutamina Q222Q y otro heterocigoto Glutamina/lisina Q222K, provinieron de un estudio preliminar titulado: “Assessment of the protective effect of alleles K222 and S127 of the prion protein gene after intracerebral inoculation of caprine Bovine Spongiform Encephalopathy in goats: weakness of K222 and encouraging preliminary results of S127”, que tenía el objetivo de definir el papel del alelo 222K frente a la EEB caprina. De estos tres últimos animales, un Q222Q y otro Q222K también presentaban serina (S) en el codón 127 (heterocigotos Glicina/Serina; G127S).

Todos los machos caprinos se esterilizaron, excepto un Q222Q, con el fin de utilizarlo como reproductor. Los animales se mantuvieron durante toda la duración del experimento en las instalaciones de nivel P3 de bioseguridad del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza, siendo necesarias para la realización de experimentos con EEB.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Genotipado

Las muestras de sangre de los animales fueron tomadas y sometidas a técnica de extracción de ADN mediante el Kit QIAGEN® (QIAamp DNA mini kit), según el

protocolo del fabricante (Anexo 4). El protocolo consiste básicamente en una digestión de 10 minutos con proteinasa K (20 ng/ml) a 56°C, precipitación con etanol, ciclos de lavado para eliminar los residuos y recuperación del ADN.

La amplificación del fragmento ORF (open reading frame) del gen *PRNP* se realizó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) con el Kit QIAGEN® (HotStarTaq® Master Mix Kit) y los cebadores PrP8 y PrP9 (Tabla 3) (Bossers *et al.*, 1996). La reacción de PCR se purificó utilizando el colector de vacío de Millipore® y la secuenciación se realizó con los mismos cebadores utilizados para la PCR.

Tabla 3: Cebadores PrP8 y PrP9.

Gen	Cebador para PCR	
<i>PRNP</i>	Forward	PrP8: 5'-CAGGTTAACGATGGTGAAAAGCCACATAGG-3'
	Reverse	PrP9: 5'-GGAATTCTATCCTACTATGAGAAAAATGAGG-3'

3.2.2.2 Inoculación

De los ocho animales, siete se inocularon y uno se utilizó como control negativo del experimento. Se prepararon dos inóculos distintos, uno con tejido cerebral de un bovino de la raza frisona infectado con EEB y el otro con el segundo pase de una cabra afectada de EEB. Para los inóculos, se homogeneizó 1g de tejido con 10 ml de solución salina normal estéril a una concentración final del 10%. Cinco animales, tres cabras Q222Q y dos animales K222K fueron inoculados con EEB bovina y los dos machos heterocigotos Glicina/Serina G127S fueron inoculados con EEB caprina. Los animales fueron anestesiados con ketamina y diazepam, y luego se realizó una incisión en la piel a una distancia de un centímetro lateralmente a la línea media entre los huesos frontales, equidistante al ángulo lateral del ojo y la base del lado craneal de la oreja. La trepanación del cráneo se realizó con un taladro especial, y se inyectaron 0,5 ml de inóculo con una aguja hipodérmica.

3.2.2.3 Tratamientos reproductivos

Las tres hembras pertenecientes al estudio y portadoras del genotipo QQ en el codón 222 fueron sometidas a un tratamiento reproductivo. En el día uno se les colocó una esponja intravaginal con progestágeno y se inyectaron 0.5 ml de Cloprostenol; en el día 14 por la mañana se realizó la extracción de la esponja intravaginal y se inyectaron 500 UI de PMSG; finalmente en el día 16, los animales fueron inseminados con semen de un caprino genotipo QQ. El diagnóstico gestacional se realizó mediante ecografía a los 35 días de la inseminación. Una de las tres hembras sometidas al tratamiento reproductivo se quedó preñada de dos cabritos y a los 5 meses fue sometida a una cesárea de emergencia debido a clínica avanzada del animal.

3.2.2.4 Necropsia de los cabritos

Los dos cabritos machos no sobrevivieron al parto y se realizó una necropsia sistemática y completa de los dos fetos en la que se cogieron muestras de distintos tejidos: nervioso (hemiencefalo, nervio braquial, mucosa olfatoria, ojo); linfoide (tercer párpado, amígdalas, linfonodo submandibular, linfonodo retrofaringeo, linfonodo mediastinico, timo, bazo); tracto gastrointestinal (lengua, esófago, duodeno, yeyuno, colón); otros órganos (testículo, páncreas, hígado, pulmón, riñón, corazón, piel, músculo anterior y músculo posterior). Todas las muestras se almacenaron por duplicado para fijación en formol al 10% y en congelación a -80° para realización de las técnicas de inmunohistoquímica y ELISA.

3.2.2.5 Evaluación clínica

El examen clínico general de los animales se realizó semanalmente, evaluándose la condición corporal y el comportamiento de los mismos. En el momento en el que se detectó cualquier cambio, se realizó una evaluación física y neurológica completa, incluyendo la evaluación de la postura, presencia de movimientos anormales (temblores, fasciculación), estado mental, comportamiento, respuesta a la amenaza, condición corporal, marcha, propiocepción, reflejos y las lesiones de piel y la pérdida de pelo. Además de la evaluación clínica, se han realizado fotografías y grabaciones de vídeo de todos los animales, con el objetivo de comparar la evolución clínica de cada caprino.

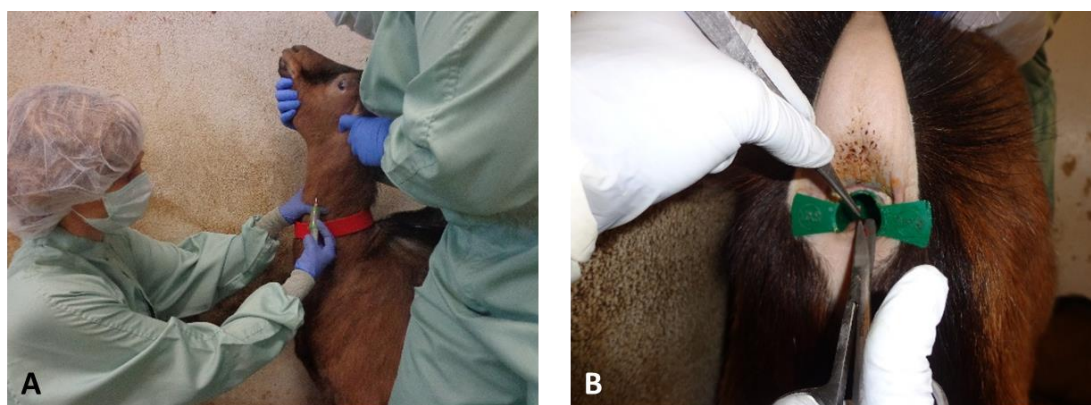
3.2.2.6 Extracción de muestras de sangre

Las extracciones de sangre (Figura 6A) se realizaron trimestralmente, utilizando cinco tubos de 10 ml: dos con anticoagulante EDTA para llevar a cabo el protocolo de extracción de las células blancas; dos con anticoagulante dextrosa citrato para el almacenamiento de sangre entera y obtención de plasma, y uno sin ningún reactivo para obtener el suero. Todo este material se ha almacenado para futuras investigaciones.

3.2.2.7 Toma de muestras de biopsia rectal

Las biopsias del tejido linfoide asociado a la mucosa recto anal (RAMALT) (Figura 6B), se realizaron trimestralmente, con el fin de comprobar la presencia o ausencia de PrP^{Sc} en este tejido. Para la realización de la técnica se ha utilizado un espejo especial, con una abertura en la parte inferior, que permitía una mejor visualización de las columnas rectales. Con la ayuda de una pinza y una tijera se tomó una muestra de aproximadamente 8 mm. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% tamponado y posteriormente se sometieron a la técnica de IHQ.

Figura 6: Actividades realizadas trimestralmente. A: Extracción de sangre. B: Técnica de biopsia retal.



3.2.2.8 Técnica de Necropsia

Los animales, cuando llegaron a la fase terminal de la enfermedad, se sacrificaron por vía intravenosa con pentobarbital sódico (Dolethal®) y posteriormente se realizó la necropsia completa y sistemática. Durante la misma, se tomaron las siguientes muestras:

tejido nervioso (médula espinal cervical, torácica y lumbar; obex; puente; mesencéfalo; cerebelo; corteza frontal y occipital; cuerpo estriado; tálamo; hipocampo; nervio trigémino; quiasma óptico; ojo; mucosa olfatoria; nervios braquial y ciático); tejido linforreticular (tercer párpado; amígdalas; linfonodos [Retrofaríngeos, mediastínicos, mesentéricos, ilíacos, pre-escapulares, submandibulares, poplíteos y mamaros]; las placas de Peyer del íleon y yeyuno; válvula ileocecal y bazo); tejidos del tracto gastrointestinal (lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, recto, hígado y páncreas); otros tejidos (pulmón, corazón, piel, riñón, vejiga urinaria, glándula adrenal, músculo tríceps braquial, músculo semitendinoso, útero, ovarios, glándula mamaria y testículo). El almacenamiento de las muestras de los tejidos se realizó por duplicado para la fijación en formol al 10% y en congelación a -80°.

3.2.2.9 Técnicas diagnosticas

3.2.2.9.1 Histología

Las secciones de tejido de todas las muestras, tras fijación en formaldehído al 10% e inclusión en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) (Anexo 2), con el fin de observar las lesiones histopatológicas en las muestras de sistema nervioso central. Para realizar el perfil histopatológico se ha valorado de forma subjetiva la vacuolización de una serie de áreas presentes en diferentes secciones del encéfalo del animal, las cuales fueron: médula oblongada, cerebelo, puente, mesencéfalo, diencéfalo, ganglios basales y corteza cerebral frontal. Esta valoración se ha realizado dando un valor a cada área entre 0 (ausencia de vacuolización) a 3 (vacuolización intensa).

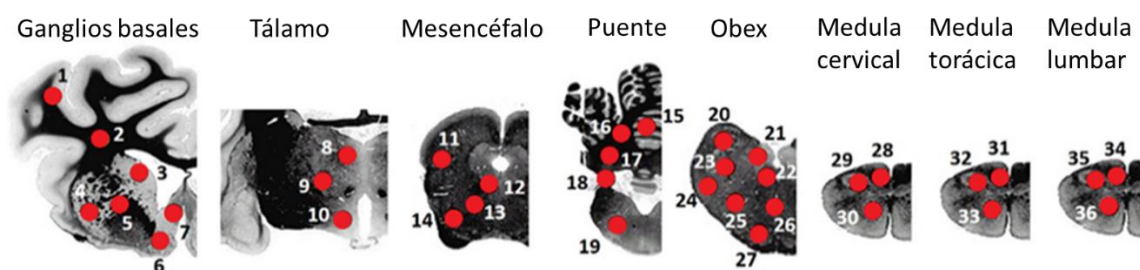
3.2.2.9.2 Inmunohistoquímica

Las secciones de 5 μ m se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína prion utilizando dos anticuerpos distintos: el anticuerpo monoclonal de ratón L42 (dilución 1:500; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), que reconoce una región del extremo C terminal de la proteína (144FGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYY166) (Harmeyer *et al.*, 1998); y el anticuerpo monoclonal de ratón P4 (1: 160; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), que reconoce un segmento del dominio N-terminal de la cola flexible de la PrP (93WGQGGSH99)

(Thuring *et al.*, 2004). Se siguió el protocolo de Monleón *et al.* (2003), que concretamente consiste en un pre-tratamiento por inmersión en ácido fórmico al 98%, digestión con proteinasa K y autoclavado hidratado para el desenmascaramiento de los epítomos, tras el cual se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína prión, L42 (R-Biopharm, Germany) a la dilución 1:500. El sistema de visualización y el cromógeno utilizados son EnVision™ (DAKO, Denmark) y diaminobencidina (DAB), respectivamente (Anexo 3).

Para realizar el perfil inmunohistoquímico se valoró de forma subjetiva la magnitud de cada uno de los tipos de depósito de PrP^{Sc} observables en una serie de áreas presentes en diferentes secciones del encéfalo del animal: corteza cerebral frontal, ganglios basales, tálamo, mesencéfalo, puente, cerebelo y médula oblongada (Figura 7).

Figura 7: Áreas del SNC valoradas mediante la técnica de IHQ. 1: sustancia gris de la corteza cerebral, 2: sustancia blanca de la corteza cerebral, 3: núcleo caudado; 4: núcleo lenticular, 5: cápsulas interna y externa, 6: núcleo accumbens, 7, área septal, 8: tálamo dorsal, 9: tálamo ventral, 10: hipotálamo, 11: cuerpo geniculado lateral, 12: núcleo oculomotor, 13: núcleo rojo, 14: sustancia negra, 15: sustancia gris cerebelosa, 16: sustancia blanca cerebelosa, 17: núcleo cerebelar profundo, 18: núcleo vestibular, 19: núcleo facial, 20: núcleo cuneado lateral, 21: DMNV (núcleo motor dorsal del nervio vago), 22: núcleo hipogloso, 23: tracto espinal del nervio trigémino, 24: tracto espinocerebelar, 25: formación reticular, 26: rafe, 27: núcleos de la oliva; 28, 31, 34: Médula espinal (cervical, torácica y lumbar de izquierda a derecha); 29, 32, 35: cuerno dorsal; 30, 33, 36: cuerno ventral.



Esta valoración se realizó proporcionando un valor a cada tipo de depósito, en cada área observada, de entre 0 (ausencia de depósito) a 3 (gran magnitud de depósito). Así mismo, se han valorado 12 patrones de depósito diferentes:

- Intraneuronal: depósito de PrP^{Sc} que se encuentra en el pericarion de las neuronas.

- Intra-astrocítico: depósito de tipo granular que se aprecia alrededor del núcleo de astrocitos.
- Intramicroglial: grandes gránulos que aparecen alrededor del núcleo de células de la microglía.
- Particulado fino: el depósito se encuentra en el neuropilo, en forma de un punteado fino.
- Particulado grueso: el depósito se encuentra en el neuropilo, en forma de un punteado grueso.
- Perineuronal: el depósito se encuentra alrededor de las neuronas, envolviéndolas.
- Lineal: este depósito se encuentra formando líneas más o menos continuas que parecen asociarse a axones neuronales.
- Estrellado: depósito radiado y ramificado que normalmente se centra en el núcleo de una célula de la glía.
- Subpial: agregados que se aprecian justo debajo de la piamadre.
- Subependimal: similar al anterior, pero se localiza debajo de la capa de células ependimales.
- Perivascular: acumulación de grosor variable alrededor de vasos sanguíneos.
- Perivacuolar: acumulación de PrP^{Sc} alrededor de vacuolas presentes en la sustancia gris o de espacios vacíos en la sustancia blanca.

3.2.2.9.3 ELISA

Se realizó la técnica de ELISA en todas las muestras recogidas de los animales sacrificados. El kit elegido fue el de la casa comercial IDEXX, concretamente el HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y utilizando el conjugado bovino en cada muestra (Anexo 9). Los valores de corte negativos utilizados para las muestras de SNC y SLR se definieron por el software del Kit, y para otros tejidos y órganos se calculó un valor de corte que consistió en la media de los valores de las muestras de todos los órganos no nerviosos ni linfoides de dos caprinos negativos, más 4 veces la desviación típica, obteniendo un valor de 0.096. Aquellas muestras que mostraron valores por encima del valor de corte establecido para tejidos no nerviosos ni linfoides, se sometieron a repetición de la técnica por duplicado con homogenizados preparados a partir de dos tallados distintos de muestra. Lo mismo se realizó en las muestras de tejido linfoide que no fueron positivas pero que presentaron valores próximos al cut off.

3.2.2.9.4 Western Blot

La técnica de Western Blot se utilizó para determinar la presencia de PrP^{Sc} y estudiar el patrón de glicosilación en muestras de obex, almacenadas a -80°C, de todos los caprinos del estudio, así como muestras de obex de animales del estudio preliminar inoculados con EEB caprina, y una de un bóvido con EEB.

Para determinar la concentración de proteínas de cada homogenizado de obex y determinar la cantidad necesaria de cada muestra para la técnica de western blot, se utilizó el Kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay. El ensayo de BCA combina la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ por proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu¹⁺) por el ácido bicinchonínico.

Para el Western Blot se utilizó el kit comercial Prionics® -Check WESTERN EEB según las instrucciones del fabricante (Anexo 8) y la inmunodetección de la proteína se realizó con dos anticuerpos distintos: el anticuerpo monoclonal 6H4 (Prionics®, Zurich, Suiza), que reconoce una región C terminal de la proteína (144FGNDYEDRY152) (Korth *et al.*, 1997); y el anticuerpo monoclonal de ratón P4 (R- Biopharm, Darmstadt, Alemania) (Thuring *et al.*, 2004) que reconocen un segmento del dominio N-terminal de la cola flexible de la PrP (93WGQGGSH99).

3.2.2.9.5 Bioensayo en ratón

La técnica de bioensayo se ha realizado para definir la infectividad de las muestras, positivas y negativas, de caprinos infectados con EEB bovina (animales del proyecto actual) y EEB caprina (proyecto preliminar), diagnosticadas por las técnicas convencionales de IHQ y ELISA permitiendo así definir adecuadamente cuáles son los materiales de riesgo de origen caprino y estimar el riesgo de la exposición humana a estos tejidos. El proyecto ha sido registrado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal, con el número PII6/16.

Los inóculos se han preparado con muestras de músculo tríceps braquial; músculo semitendinoso y con encéfalo de seis caprinos con distintos genotipos en el codón 222 (Tabla 4)

Tabla 4: Animales (genotipo y cepa de EEB) de los que provienen las muestras utilizadas para preparación de los inóculos y si las muestras son positivas o negativas mediante las técnicas diagnósticas.

Animal (genotipo y EEB)	Inóculos	Diagnóstico
Genotipo Q222Q (EEB caprina)	Encéfalo	Positivo
	Músculo semitendinoso	Negativo
Genotipo Q222K (EEB caprina)	Encéfalo	Positivo
	Músculo semitendinoso	Negativo
Genotipo K222K (EEB caprina)	Encéfalo	Positivo
	Músculo semitendinoso	Positivo
	Músculo tríceps braquial	Positivo
Genotipo Q222Q (EEB bovina)	Encéfalo	Positivo
	Músculo semitendinoso	Negativo
	Músculo tríceps braquial	Negativo
Genotipo K222K (EEB bovina)	Encéfalo	Positivo
	Músculo semitendinoso	Negativo
	Músculo tríceps braquial	Negativo
Control negativo	Encéfalo	Negativo

Para la elaboración de los inóculos, se utilizaron muestras de los distintos tejidos almacenadas a -80°C . De cada muestra se utilizó 0,5 mg de tejido que se homogenizó en 5 ml de suero fisiológico. El homogenizado se filtró mediante una gasa estéril y se añadieron $2,5 \mu\text{l}$ de antibiótico. Los inóculos se sembraron en placas de Petri agar sangre y se incubaron a 37°C durante 48 horas, para comprobar su esterilidad.

La línea de ratón utilizada fue la transgénica humana Tg340, que expresa cuatro veces la proteína prion humana y es metionina para el codón 129. Los animales se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intracerebralmente con $20 \mu\text{l}$ de homogenizado y después se administró a cada ratón una dosis de analgésico ($0,3 \text{ mg por kg}$ de buprenorfina diluida en suero fisiológico). Se han inoculado seis animales por jaula, y una jaula por cada inóculo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Período de incubación y signos clínicos

Todos los animales inoculados con EEB desarrollaron signos clínicos y fueron sacrificados de manera humanitaria. Los caprinos inoculados con EEB bovina presentaron un periodo de incubación más corto que los animales con EEB caprina con el polimorfismo G127S, además, también se pudo constatar una diferencia en el periodo de incubación entre los distintos genotipos para el codón 222 (Tabla 5).

Tabla 5: Período de incubación, edad a la inoculación, período de supervivencia y duración de los signos clínicos de los animales con distintos genotipos y distintos inóculos.

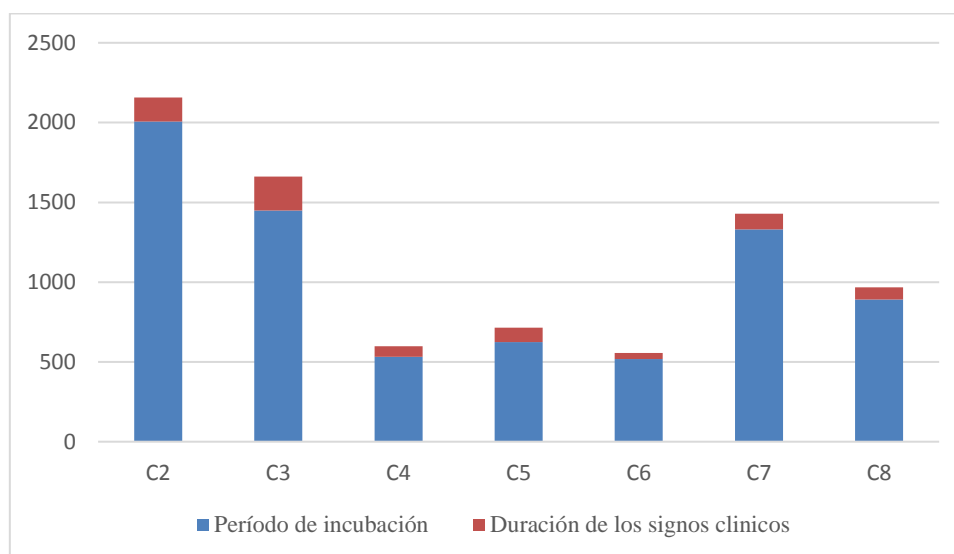
ID	Genotipo codón 222	Genotipo codón 127	Edad inoculación	Inoculo	Período de incubación	Período de supervivencia	Duración de los signos clínicos
C-1	QQ	GG	-	Control -	-	-	-
C-2	QQ	GS	525 días	EEB caprina	2007	2158	151
C-3	QK	GS	511 días	EEB caprina	1448	1661	213
C-4	QQ	GG	176 días	EEB bovina	533	598	65
C-5	QQ	GG	176 días	EEB bovina	625	714	89
C-6	QQ	GG	176 días	EEB bovina	518	556	38
C-7	KK	GG	837 días	EEB bovina	1330	1429	99
C-8	KK	GG	845 días	EEB bovina	892	967	75

ID: Identificación del animal; Q: Glutamina; K: Lisina; G: Glicina; S: Serina; Control -: Control negativo.

El primer animal que mostró signos clínicos a los 518 días post inoculación fue el C6, portador del genotipo Q222Q inoculado con EEB bovina, y presentó un período de clínica de 38 días. Los otros dos animales Q222Q inoculados con EEB bovina fueron diagnosticados con signos clínicos a los 533 y 625 dpi y presentaron un período de supervivencia de 598 y 714, respectivamente. Los dos caprinos K222K iniciaron los signos clínicos a los 892 y 1330 dpi, presentando un período de supervivencia de 967 y 1429 dpi.

Las dos cabras inoculadas con EEB caprina, heterocigotas GS en el codón 127, presentaron los periodos de incubación más largos, 1448 y 2007 dpi. Además, la duración de los signos clínicos también fue más larga, 213 y 151 días, respectivamente (Gráfico 1).

Gráfico 1: Comparación entre el período de incubación y duración de los signos clínicos entre los siete animales inoculados con EEB.



En la fase inicial de los signos clínicos, los animales inoculados con EEB bovina y de genotipo QQ presentaban hiperexcitabilidad y estado de alerta (Figura 8A). El animal C4 presentó hipermetría, postura anormal del tercio posterior, cabeza y orejas caídas, además de temblores y reflejos disminuidos. La cabra C5 demostró parpadeo intermitente, movimiento anormal de orejas, temblores al manejo, hipermetría, reflejo palpebral disminuido, además de positividad al test de rascado, así como presencia de alopecia. El animal C6 presentaba una postura anormal con las extremidades delanteras separadas, la cabeza baja y las orejas hacia delante, realizaba movimientos bruscos de cabeza, parpadeo intermitente con temblor de la cabeza, incoordinación y ataxia, además de presentar los reflejos muy disminuidos.

Los caprinos C7 y C8, de genotipo K222K, presentaron sobre todo postura anormal de la cabeza, ataxia, déficit propioceptivo y test de rascado positivo.

Los animales con EEB caprina, C2 y C3, mostraron un estado mental deprimido, ataxia, déficit propioceptivo y debilidad de los miembros posteriores.

Con la evolución de la enfermedad, los animales (independientemente del inóculo) presentaron clínica muy similar, sobre todo debilidad, pérdida de peso y estado mental deprimido (Figura 8B). En todos los animales se observaron una serie de signos neurológicos compatibles con ataxia, inclinación de la cabeza y del cuello (Figura 8C), déficit propioceptivo (Figura 8D), temblores de cabeza, además de una posición característica de las orejas, que se encontraban hacia adelante y hacia abajo. La mayoría

de los animales también presentaron prurito y lesiones de piel, y prueba del rascado positiva. En la fase terminal de la enfermedad los caprinos mostraron imposibilidad para levantarse y dificultad para alimentarse (Figura 8E y 8F).

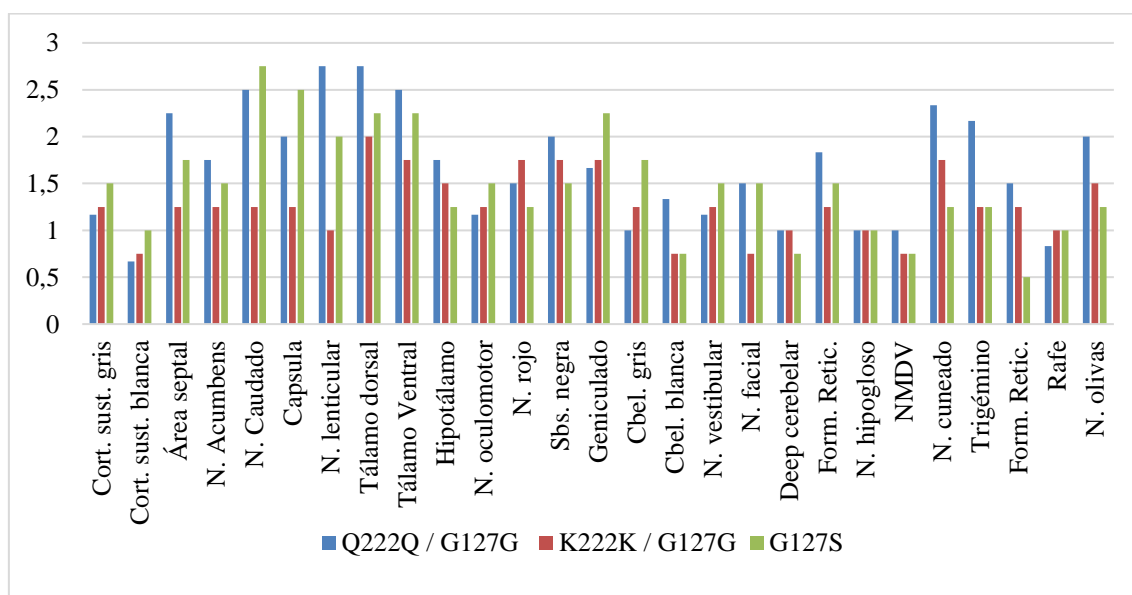
Figura 8: Caprinos inoculados intracerebralmente con EEB con presencia de signos clínicos. A: Animal Q222Q con EEB bovina con presencia de hiperexcitabilidad. B: Animal K222K con EEB bovina con déficit propioceptivo. C: Animal K222K con EEB bovina con inclinación de la cabeza y debilidad de los miembros posteriores. D: Animal Q222K con EEB caprina con caquexia y estado mental deprimido. E: Animal K222K con EEB caprina con debilidad y dificultad para mantenerse de pie. F: Animal Q222Q con EEB bovina en fase terminal de la enfermedad.



3.3.2 Análisis histológico

Todas las muestras de sistema nervioso tomadas tras la necropsia se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y fueron valoradas microscópicamente. En todas las áreas del encéfalo y tramos de la medula oblongada se observó la presencia de vacuolización en distintos grados de severidad entre 0 y 3. Los caprinos con EEB bovina de genotipo Q222Q presentaron, en casi todas las áreas valoradas, mayor grado de vacuolización que los animales K222K y G127S, siendo los animales C4 y C6 los que obtuvieron mayor vacuolización. Los demás caprinos presentaron grados de vacuolización muy similares, con excepción del animal C7, el cual presentó un grado más bajo. Las áreas de intensa espongirosis en los animales Q222Q fueron en el área septal, núcleo caudado y lenticular de los ganglios basales; áreas dorsal y ventral del tálamo; y en el núcleo cuneado lateral y tracto espinal del nervio trigémino del obex. En los caprinos K222K las áreas más afectadas fueron: las áreas dorsal y ventral del tálamo; el núcleo rojo, la sustancia negra y el núcleo geniculado del mesencéfalo y el núcleo cuneado. Los animales G127S presentaron mayor grado de vacuolización en el núcleo caudado, núcleo lenticular y cápsula externa en el área de los ganglios basales; en el tálamo dorsal y ventral; y en el núcleo geniculado lateral del mesencéfalo (Gráfico 2).

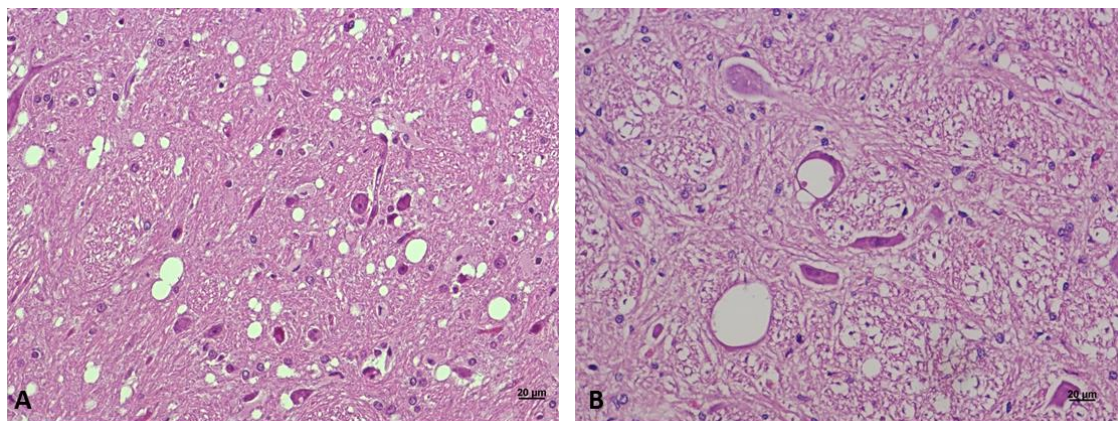
Gráfico 2: Comparación de la vacuolización de los distintos núcleos y áreas del SNC, entre los genotipos Q222Q y K222K (EEB bovina); y caprinos G127S (EEB caprina).



Cort.: Corteza; Sust.: Sustancia; N.: Núcleo; Cbel.: Cerebelo; Form.: formación; Retic.: Reticular; DMNV: Núcleo motor dorsal del nervio vago.

También se observó que los animales Q222Q presentaron mayor vacuolización en el neuropilo (Figura 9A), mientras que los K222K la vacuolización predominante se observó en el pericarión (Figura 9B). De los animales G127S con EEB caprina, el animal C2 así como los Q222Q con EEB bovina presentaron mayor vacuolización en el neuropilo, y en el animal C3 se observó vacuolización en grados similares en el neuropilo y en el pericarión.

Figura 9: A: HE Obex de caprino genotipo Q222Q, tracto espinal del nervio trigémino con presencia de vacuolización en el neuropilo (10x). B: HE Obex de caprino genotipo K222K, área de la formación reticular con presencia de vacuolización en el pericarión neuronal (20x).



3.3.3 Detección de la PrP^{Sc} en SNC y SNP

Todas las muestras tomadas en las necropsias se analizaron mediante las técnicas de inmunohistoquímica y ELISA. En las muestras del animal C1, utilizado como control negativo del experimento, no se observó positividad en ninguna de las muestras por las dos técnicas, comprobando la negatividad del animal. En las distintas áreas del SNC de los siete animales inoculados con EEB se observó la presencia de la PrP^{Sc} mediante la técnica de IHQ, con distintos patrones e intensidad.

Entre los animales inoculados con EEB caprina de genotipo G127S, el animal C2 presentó mayor acumulo de PrP^{Sc} que el animal C3, con mayor intensidad en la sustancia gris de la corteza frontal; núcleo caudado y capsula externa de los ganglios basales (Figura 10C) y sustancia gris del cerebelo. El animal C3, así como el animal C2 también presentó gran cantidad de PrP^{Sc} en la sustancia gris de la corteza frontal, pero el núcleo dorsal del nervio vago y los núcleos de las olivas del obex fueron los más afectados.

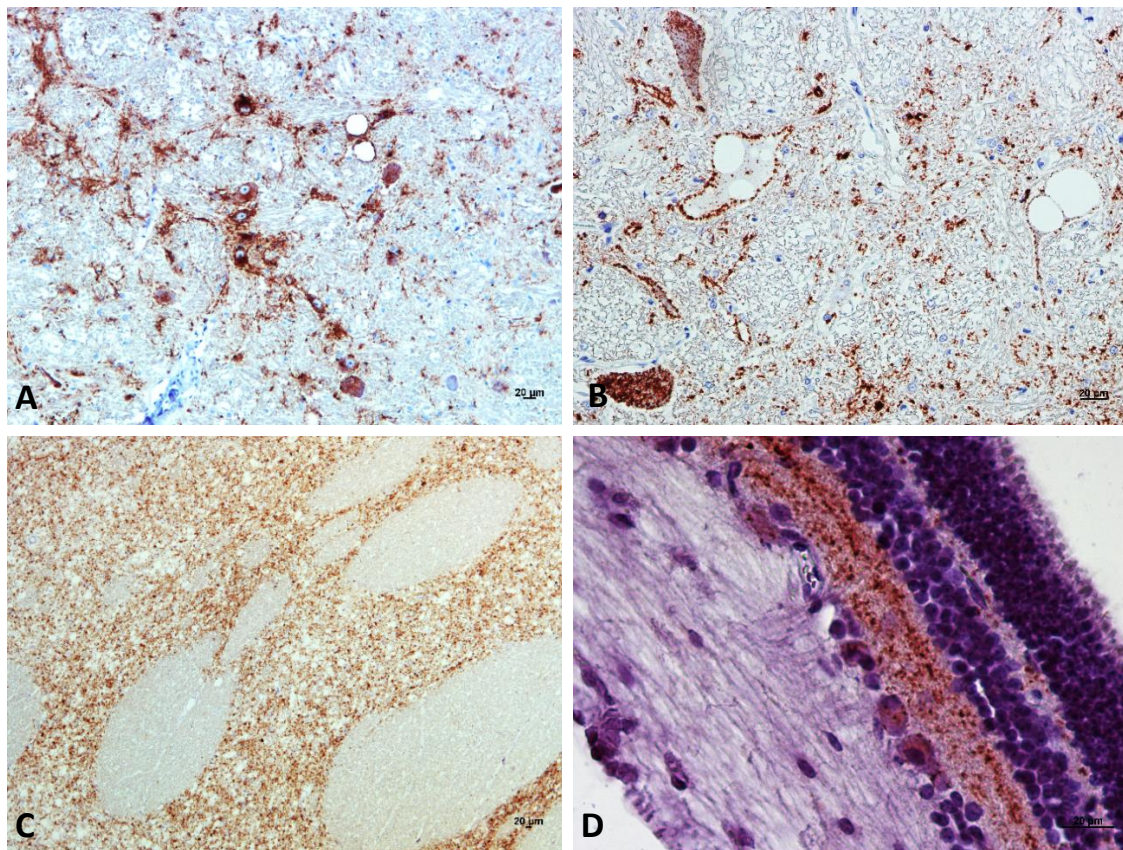
Entre los animales inoculados con EEB bovina de genotipo Q222Q, el animal C4 presentó mayor positividad en el núcleo caudado y capsula externa de los ganglios basales en el núcleo geniculado y en la sustancia negra del mesencéfalo. El C5 tuvo como áreas más afectadas la capsula externa y el núcleo lenticular de los ganglios basales y las áreas dorsal y ventral del tálamo. El núcleo caudado de los ganglios basales la sustancia negra del mesencéfalo el cuneado lateral del obex y la medula cervical fueron las áreas más afectadas del animal C6.

Los animales K222K presentaron menor acumulo de PrP^{Sc} que los animales Q222Q. En el animal C7 no se identificó la presencia de PrP^{Sc} en la corteza frontal y ganglios basales y la cantidad de PrP^{Sc} en tálamo fue extremadamente baja, tanto en el neurópilo como en localización intracelular. En otras áreas, presentó un mayor acumulo de PrP^{Sc} sobretodo en la sustancia negra (Figura 10A) en el núcleo rojo del mesencéfalo (Figura 10B) en el núcleo caudado, rafe y núcleos de la oliva del obex. En el animal C8 se observó que la sustancia gris de la corteza frontal; el núcleo caudado y el núcleo lenticular de los ganglios basales; el área ventral del tálamo e hipotálamo y el tracto espinocerebelar del obex fueron las áreas más afectadas.

Comparando los siete caprinos inoculados, todos los animales demostraron altos niveles de acumulación de PrP^{Sc} en las distintas áreas del SNC, principalmente en los ganglios basales, mesencéfalo, tálamo / hipotálamo y obex, seguidas de la corteza cerebral, el cerebelo y las medulas cervical, torácica y lumbar. Las áreas más afectadas fueron los núcleos lenticular y caudado y la capsula externa en los ganglios basales la sustancia negra y el núcleo geniculado en el mesencéfalo, tálamo e hipotálamo seguidos del núcleo motor dorsal de nervio vago y la formación reticular.

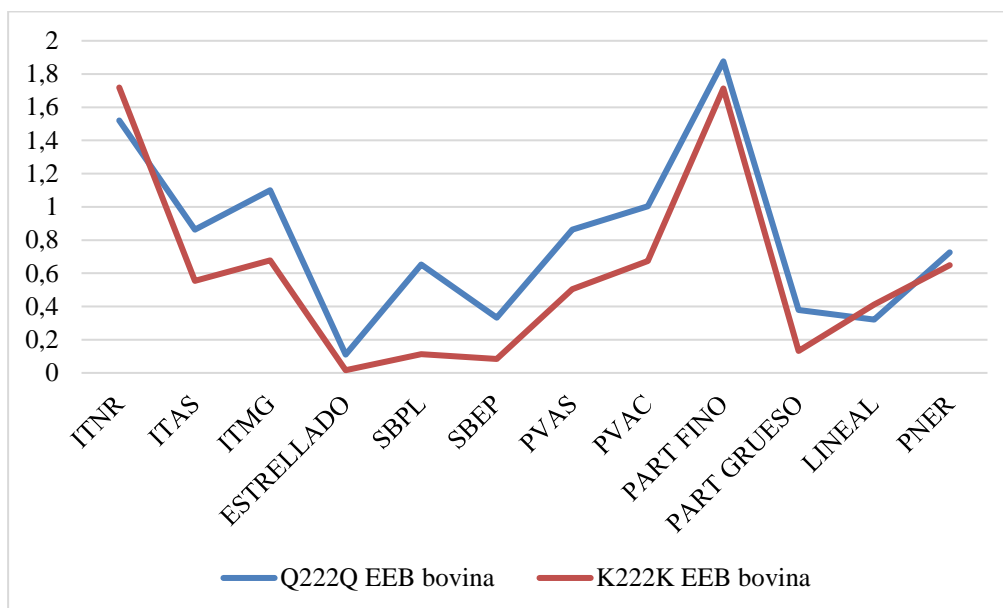
En relación a los distintos depósitos observados, el intraneuronal fue el más intenso de los depósitos intracelulares en todos los animales, independientemente del genotipo, no obstante, la PrP^{Sc} también se observó en células de la microglia y astrocitos. En el caso de los depósitos extracelulares, el más destacado fue el particulado fino, seguido del perivacuolar, perivascular y perineuronal. Otros agregados como el estrellado y el lineal se observaron en baja intensidad en casi todas las áreas, con excepción de la corteza frontal y el cerebelo que presentaron un depósito estrellado moderado y de la sustancia negra del mesencéfalo que presentó gran cantidad de depósito lineal. Los depósitos subpial, subependimal y particulado grueso, sobre todo en los animales K222K con EEB bovina, fueron considerablemente bajos (Gráfico 3).

Figura 10: Detección de agregados de PrP^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Sustancia negra y mesencéfalo (K222K con EEB bovina; 10x). B: Núcleo rojo y mesencéfalo (K222K con EEB bovina; 20x). C: Cápsula interna, externa y ganglios basales (Q222Q/G127S con EEB caprina; 5x). D: Capa plexiforme interna, capa plexiforme externa y células ganglionares, en la retina (Q222Q con EEB caprina; 20x).



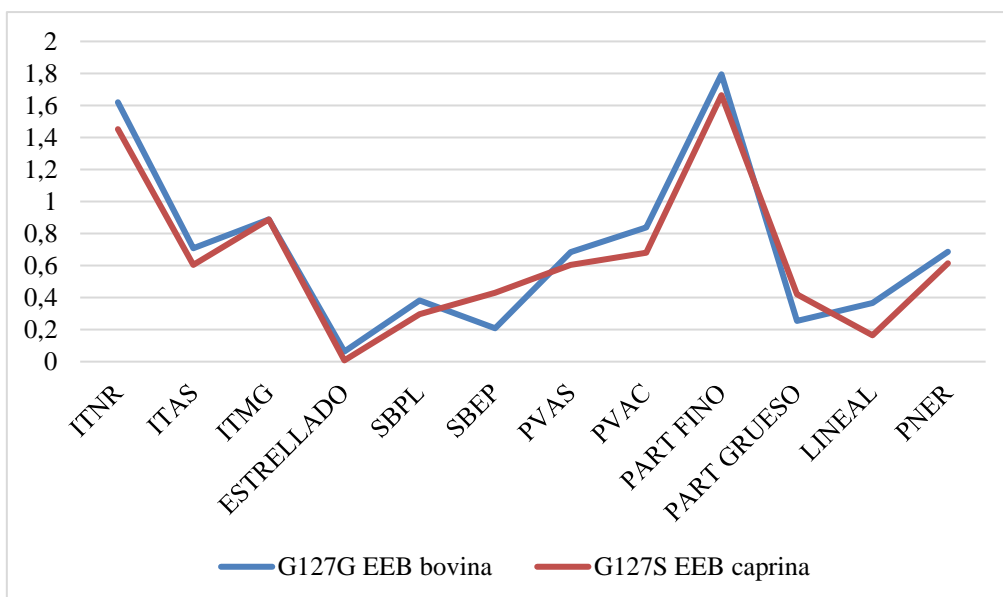
Entre los animales con distintos genotipos en el codón 127, los G127G inoculados con EEB bovina y los G127S inoculados con EEB caprina, también se observó un patrón de depósito de PrP^{Sc} muy similar, sin embargo, casi todos los depósitos fueron levemente más intensos en los animales G127G inoculados con EEB bovina, con excepción del subependimal y particulado grueso que fueron mayores en los animales G127S con EEB caprina (Gráfico 4).

Gráfico 3: Comparación entre el patrón de acumulación de PrP^{Sc} entre los distintos grupos de animales, genotipos Q222Q y K222K, inoculados con EEB bovina.



ITNR: Intraneuronal; ITAS: Intra-astrocítico; ITMG: Intramicroglial; SBEP: Subependimal; SBPL: Subpial; PVAS: Perivascular; PVAC: Perivacuolar; PART FINO: Particulado fino; PART GRUESO: Particulado grueso; PNER: Perineuronal; LINR: Lineal; PNER: Perineuronal;

Gráfico 4: Comparación entre el patrón de acumulación de PrP^{Sc} en los grupos de animales con distintos genotipos en el codón 127 (G127S y G127G).



ITNR: Intraneuronal; ITAS: Intra-astrocítico; ITMG: Intramicroglial; SBEP: Subependimal; SBPL: Subpial; PVAS: Perivascular; PVAC: Perivacuolar; PART FINO: Particulado fino; PART GRUESO: Particulado grueso; PNER: Perineuronal; LINR: Lineal; PNER: Perineuronal.

Mediante la técnica de ELISA se obtuvo positividad, según el valor de corte proporcionado por el software del Kit (Tabla 6), en casi todas las áreas del SNC de todos los animales, con excepción del animal C7, portador del genotipo K222K, en el cual no se identificó positividad en las áreas de corteza frontal y ganglios basales, y la positividad en tálamo fue muy baja.

La PrP^{Sc} también se identificó mediante IHQ en las muestras del ojo de todos los animales inoculados con EEB bovina y EEB caprina, y mediante la técnica rápida de ELISA en cuatro de los siete animales (C2, C3, C4 y C8). Los depósitos de PrP^{Sc} de patrón granular y diseminado fueron característicos de la retina, observándose en la capa plexiforme interna, capa plexiforme externa y en las células ganglionares (Figura 10D), en este último caso fundamentalmente de forma intracelular. En los nervios braquial y ciático no se observó positividad en ningún de los siete animales con EEB.

Tabla 6: Distribución de la PrP^{Sc} en las distintas áreas del SNC y SNP mediante las técnicas de IHQ y ELISA.

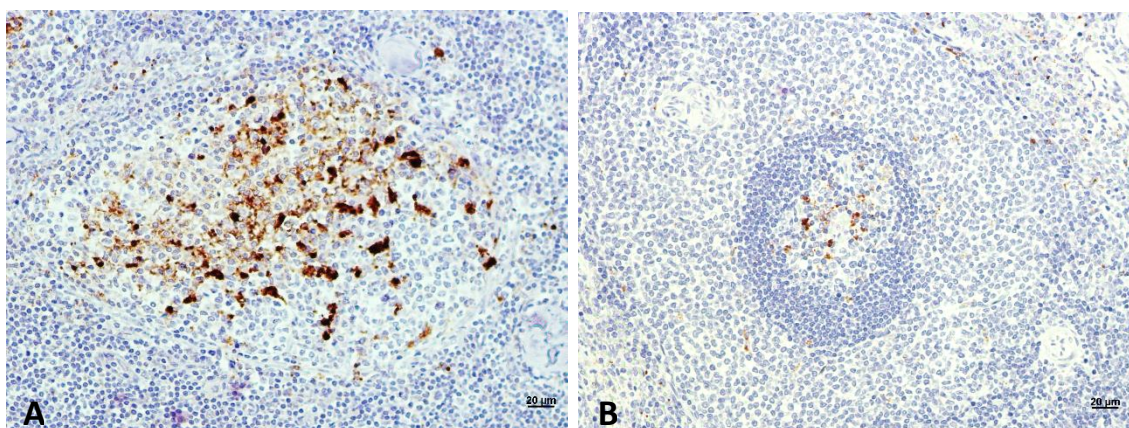
Animal	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Polimorfismo codón 222	QQ		QK	QQ			KK	
Polimorfismo codón 127	GG	GS		GG				
Corteza cerebral	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	-
Ganglios basales	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	-
Tálamo	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	-
Mesencéfalo	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Puente	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Cerebelo	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Médula cervical	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Médula torácica	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Médula lumbar	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	+	+	+
Ojo	IHQ	-	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	+	-	-	-
Nervio braquial	IHQ	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-
Nervio ciático	IHQ	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-

IHQ: inmunohistoquímica.

3.3.4 Detección de la PrP^{Sc} en SLR

En los tejidos del SLR la positividad encontrada fue variable entre los distintos animales (Tabla 7). En el tercer párpado no se identificó la PrP^{Sc} en ninguna de las muestras, mientras que en los linfonodos estudiados, el depósito de la proteína no sólo se detectó en aquellos cercanos al punto de inoculación, sino también en los linfonodos más lejanos, como en el poplíteo y el precural. Mediante IHQ se observó que la acumulación de PrP^{Sc} estaba asociada principalmente a células dendríticas foliculares de la zona clara de los folículos secundarios, y a macrófagos de cuerpo tingible (MCT) de las zonas clara y oscura de esos folículos (Figura 11A).

Figura 11: Detección de agregados de PrP^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Macrófagos de cuerpo tingible y células foliculares dendríticas, linfonodo submandibular (Q222Q con EEB bovina; 20x). B: Bazo (Q222Q con EEB bovina; 20x).



En las muestras del animal C2, Q222Q/G127S inoculado con EEB caprina, no se observó la presencia de la PrP^{Sc} en ningún de los tejidos linfoides y en el C5, Q222Q inoculado con EEB bovina, se identificó positividad solo en el bazo mediante la técnica de ELISA. Sin embargo, en los demás animales la PrP^{Sc} sí fue detectada en un mayor número de órganos linfoides. En el animal C3 mediante inmunohistoquímica la PrP^{Sc} fue observada en los linfonodos retrofaringeo, mediastínico, mesentérico, preescapular, poplíteo y precural. En el caprino C4 se observó positividad en los linfonodos más cercanos al punto de inoculación, en el linfonodo submandibular y retrofaringeo por IHQ y ELISA, en el preescapular mediante IHQ, además de positividad en las muestras de tonsila y bazo por ELISA. En el animal C6 en se detectó la PrP^{Sc} en los linfonodos

submandibular y retrofaringeo mediante las dos técnicas, así como en el bazo (Figura 11B) en los linfonodos mesentérico y precural la positividad se observó solo por IHQ.

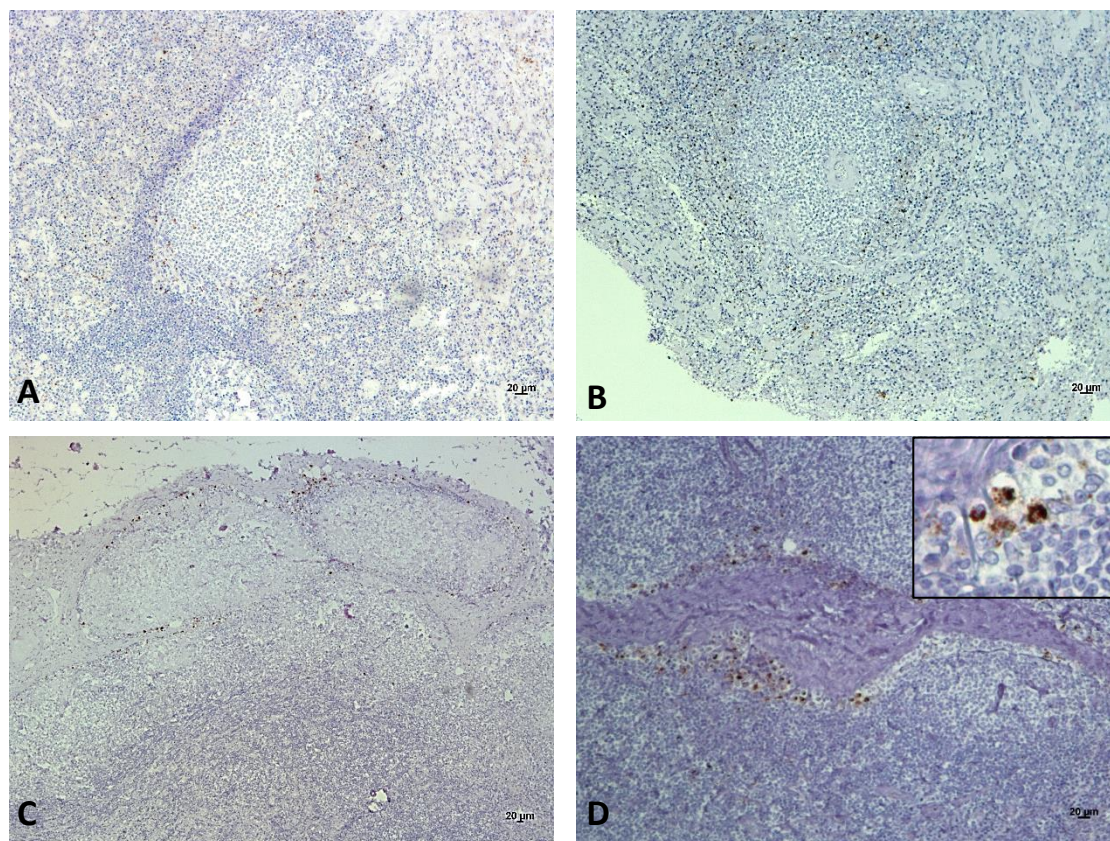
Tabla 7: Distribución de la PrP^{Sc} en el SLR mediante las técnicas de IHQ y ELISA.

Animal		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Polimorfismo codon 222		QQ		QK	QQ			KK	
Polimorfismo codon 127		GG	GS		GG				
Tonsila	IHQ	-	-	-	-	-	-	+	-
	ELISA	-	-	-	+	-	-	-	-
Tercer párpado	IHQ	-	/	-	-	-	-	/	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LN Submandibular	IHQ	-	-	-	+	-	+	+	-
	ELISA	-	-	-	+	-	+	-	+
LN Retrofaringeo	IHQ	-	-	+	+	-	+	+	+
	ELISA	-	-	-	+	-	+	-	-
LN Mesentérico	IHQ	-	-	+	-	-	+	+	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo	IHQ	-	-	-	-	-	+	+	-
	ELISA	-	-	-	+	+	+	+	-
LN Mediastínico	IHQ	-	-	+	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LN Preescapular	IHQ	-	-	+	+	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LN Ilíaco	IHQ	-	-	-	-	-	-	+	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LN Poplíteo	IHQ	-	-	+	-	-	-	+	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LN Precural	IHQ	-	-	+	-	-	+	+	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-

IHQ: inmunohistoquímica; LN: linfonodo; /: muestra no valorada.

En el caso del caprino C7, K222K, se observó un patrón de acumulación de la PrP^{Sc} distinto al de los otros animales en el tejido linfoide. En los linfonodos submandibular, retrofaringeo y poplíteo, por IHQ, se observó la PrP^{Sc} no solo en el centro germinativo del folículo linfoide, sino que, en los linfonodos ilíaco, poplíteo y precural se detectó positividad en las áreas subcortical, peritrabecular y en el manto de los folículos linfoides (Figura 12C y 12D). En este animal también se detectó la PrP^{Sc} en la tonsila por IHQ y en el bazo por ambas técnicas, siendo este último distinto el patrón de depósito, observándose la PrP^{Sc} no solamente en los centros germinativos de los folículos (Figura D), sino también en la región marginal del folículo linfoide (Figura 12A y 12B). En el otro caprino K222K, el C8, se observó positividad solo en el linfonodo submandibular mediante ELISA y en retrofaringeo por IHQ.

Figura 12: Tejido linfoide de cabra K222K inoculado con EEB bovina. A: Bazo con acumulo de PrP^{Sc} en la región marginal del folículo linfoide (10x). B: Bazo con acumulo de PrP^{Sc} en la región marginal del folículo linfoide (10x) C: Linfonodo poplíteo con acumulo de PrP^{Sc} en el área cortical (5x). D: Linfonodo precural acumulo de PrP^{Sc} en el área peritrabecular (10x).



Las muestras de amígdala del animal C4, bazo del C5 y linfonodo submandibular del caprino C6, se diagnosticaron como positivas por ELISA tras la repetición de la técnica, que se realizó debido al alto valor obtenido en la primera prueba (>0.096) (Tabla 8).

Tabla 8: Muestras con valor de corte por encima de 0.096 repetidas por duplicado.

Caprino	C4	C5	C6
Tejido	Amígdala	Bazo	L. submandibular
Valor 1ª prueba	0.105	0.127	0.099
Valor repetición	0.219*	0.279*	1.399*
Valor repetición	0.046	0.102	0.055

* Valores positivos según el valor de corte ofrecido por el software del Kit; L: Linfonodo.

3.3.5 Detección de la PrP^{Sc} en tracto gastrointestinal

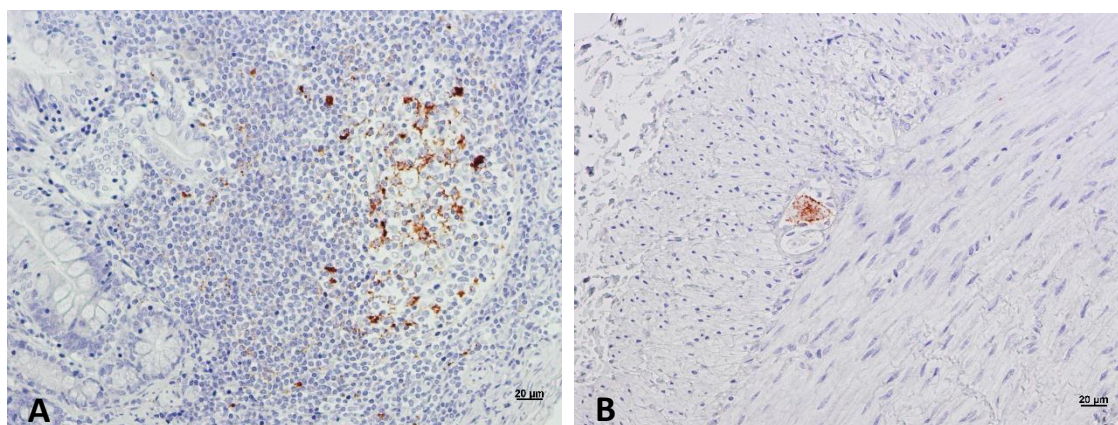
En muestras del tracto gastrointestinal se detectó la PrP^{Sc} únicamente mediante la técnica de IHQ y solo en los distintos tramos del intestino delgado e intestino grueso (Tabla 9), con excepción del recto, que no fue positivo en ninguno de los animales. En los animales C2, C5, C6 y C8 no se detectó positividad en ninguna de las muestras. En las muestras de duodeno y válvula ileocecal del animal C3 la PrP^{Sc} se observó asociada al tejido linfoide y a las neuronas del plexo mientérico del sistema nervioso entérico, así como en las neuronas de plexo del ciego y en tejido linfoide del colón. En el caprino C4 se observó positividad en el tejido linfoide del duodeno e íleon (Figura 13A), y en el plexo mioentérico del íleon (Figura 13B) y colón. Las muestras del animal C7 evidenciaron la presencia PrP^{Sc} en el tejido linfoide del duodeno e íleon; y en el yeyuno, íleon, válvula ileocecal, ciego y colón en neuronas del sistema nervioso entérico.

Tabla 9: Distribución de la PrP^{Sc} en el tracto gastrointestinal mediante las técnicas de IHQ y ELISA.

Animal		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Polimorfismo codón 222		QQ		QK	QQ			KK	
Polimorfismo codón 127		GG	GS		GG				
Lengua	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Esófago	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Rumen	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Réticulo	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Omaso	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Abomaso	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodeno	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeyuno	IHQ (L/N)	-/-	-/-	+/+	-	-/-	-/-	-/+	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Íleon	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Válvula ileocecal	IHQ (L/N)	-/-	-/-	+/+	-	-/-	-/-	-/+	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciego	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/+	-	-/-	-/-	-/+	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Colón	IHQ (L/N)	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Recto	IHQ (L/N)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-

IHQ: inmunohistoquímica; L: PrP^{Sc} en tejido linfoide; N: PrP^{Sc} asociada a neuronas del SNE.

Figura 13: Detección de agregados de PrP^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A: Tejido linfoide, íleon (Q222Q con EEB bovina; 20x). B: Neuronas del plexo nervioso e íleon (Q222Q con EEB bovina; 20x).



3.3.6 Detección de la PrP^{Sc} en otros órganos y tejidos

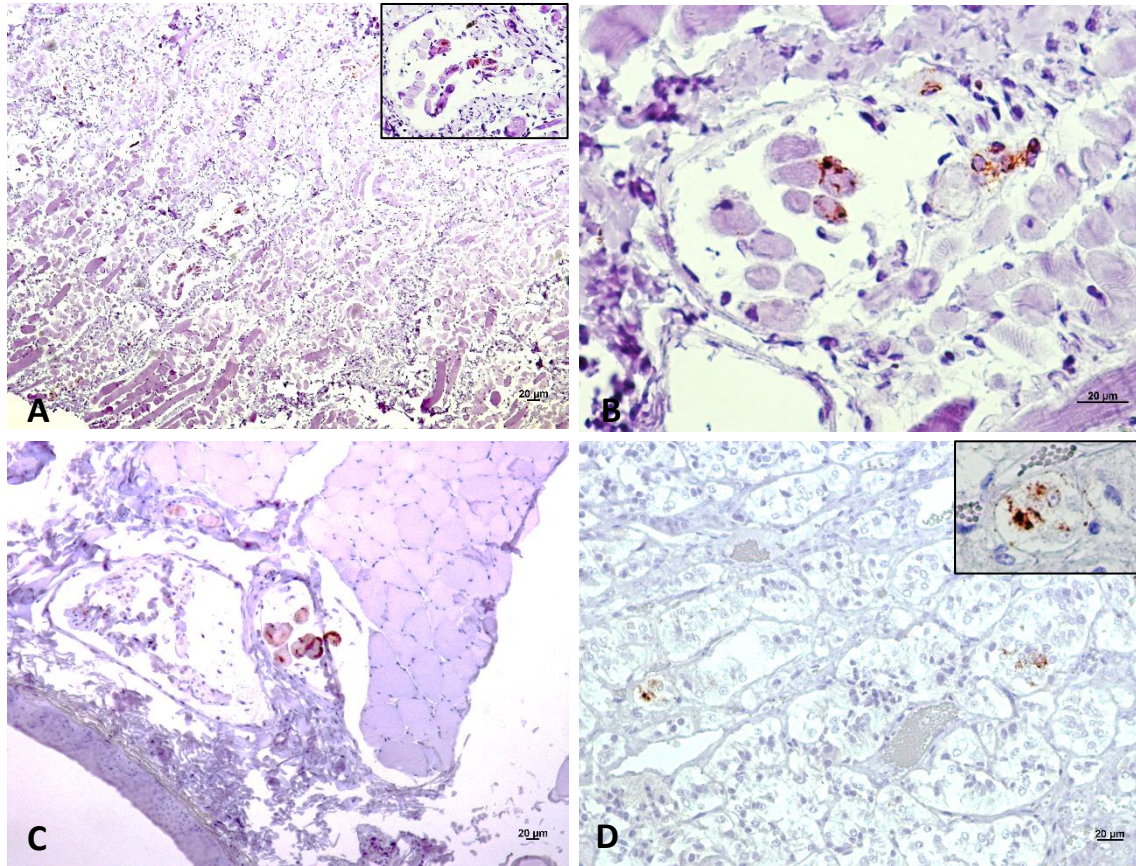
En muestras de otros tejidos y órganos la positividad fue baja (Tabla 11), siendo detectada únicamente en las muestras de músculo exocular, en los husos neuromusculares (Figura 14A y 14B), de todos los animales por inmunohistoquímica y mediante ELISA en los animales C2, C3 y C8. En la muestra del músculo tríceps braquial, en husos nerviosos y fascículos nerviosos (Figura 14C), del animal C3, Q222K/G127S inoculado con EEB caprina. También se detectó PrP^{Sc} por IHQ en la glándula adrenal de la cabra C7, de genotipo K222K con EEB bovina, en la cual se observaron depósitos de PrP^{Sc} a nivel de las células cromafines (Figura 14D) y mediante ELISA en el animal C4 (Q222Q). Las muestras de músculo exocular de los animales C3 y C8 se diagnosticaron como positivas mediante ELISA tras la repetición de la técnica por duplicado (Tabla 10).

Tabla 10: Muestras con valor de corte por encima de 0.096 repetidas por duplicado.

Caprino	C3	C8
Tejido	Musculo exocular	Musculo exocular
Valor 1ª prueba	0.146	0.112
Valor repetición	0.268*	0.149*
Valor repetición	0.065	0.083

* Valores positivos según el valor de corte ofrecido por el software del Kit.

Figura 14: Detección de agregados de PrP^{Sc} en distintos tejidos y órganos mediante IHQ con el anticuerpo L42. A y B: Husos nerviosos, músculo exocular (Q222Q con EEB bovina 5x y 40x). C: Husos nerviosos y fascículos nerviosos, músculo tríceps braquial (Q222K/G127S, con EEB caprina; 10x) D: Depósitos asociados a las células cromafines, glándula adrenal (K222K con EEB bovina; 20x).



En las muestras de los distintos tejidos y órganos tomados en la necropsia de los dos cabritos y posteriormente sometidas a las técnicas de inmunohistoquímica y ELISA, así como en las muestras de biopsia rectal tomadas cada tres meses y sometidas a IHQ, no se detectó la presencia de la PrP^{Sc}.

Tabla 11: Distribución de la PrP^{Sc} en otros órganos mediante las técnicas de IHQ y ELISA.

Animal		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Polimorfismo codón 222		QQ		QK	QQ			KK	
Polimorfismo codón 127		GG	GS		GG				
Músculo exocular	IHQ	-	+	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	+	+	-	-	-	-	+
Corazón	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo tríceps braquial	IHQ	-	-	+	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo semitendinoso	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Páncreas	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Vejiga	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
Glándula adrenal	IHQ	-	-	-	-	-	-	+	-
	ELISA	-	-	-	+	-	-	-	-
Placenta	IHQ	/	/	/	/	-	/	/	/
	ELISA	/	/	/	/	-	/	/	/
Glándula mamaria	IHQ	/	/	/	-	-	-	/	/
	ELISA	/	/	/	-	-	-	/	/
Piel	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-

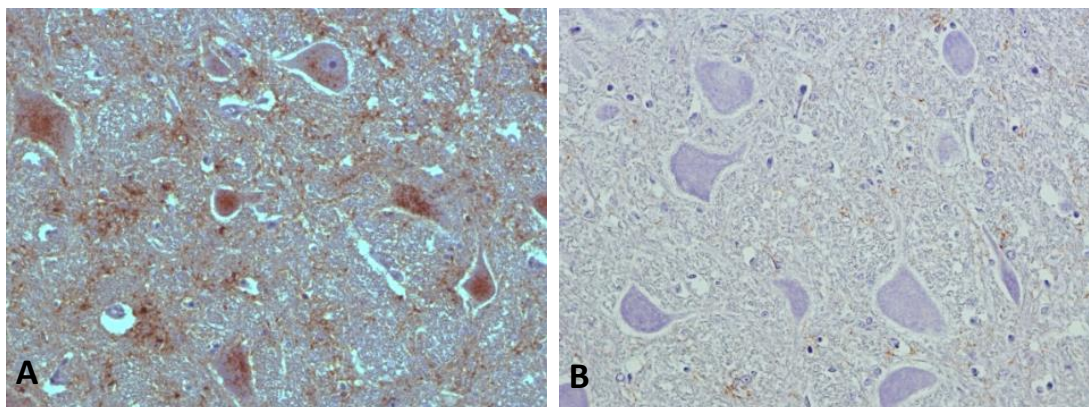
IHQ: inmunohistoquímica;

3.3.7 Caracterización de cepas

3.3.7.1 Inmunohistoquímica

La caracterización de cepas se realizó, en muestras del sistema nervioso central mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se utilizó el anticuerpo C-terminal L42, que demostró un marcaje intenso intraglial e intraneuronal de los agregados de PrP^{Sc} en todos los animales (Figura 15A). En contraste con el anticuerpo N-terminal P4 se demostró un punteado fino y difuso intra y extracelular (Figura 15B).

Figura 15: Muestra de mesencéfalo de una cabra Q222Q inoculada con EEB bovina. A: Anticuerpo L42 (20x). B: Anticuerpo P4 (20x).

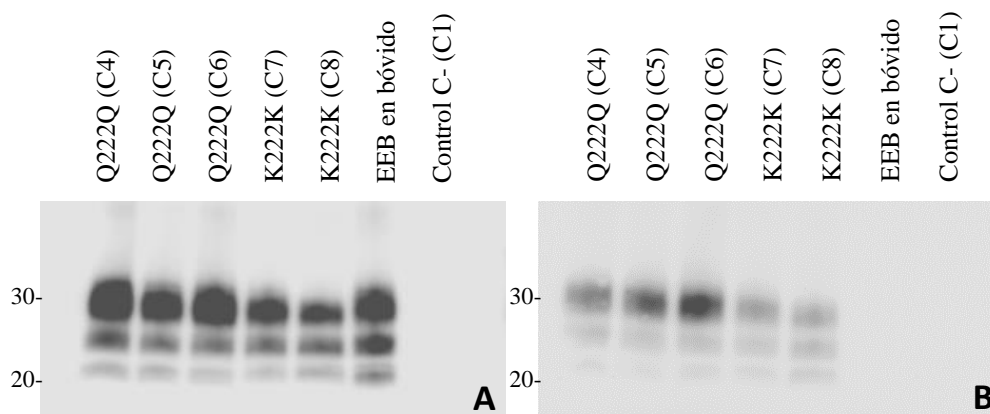


3.3.7.2 Western Blot

La técnica WB reveló con el anticuerpo 6H4 el mismo patrón de glicosilación, presencia de las bandas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada, en los caprinos inoculados con EEB bovina con distintos polimorfismos en el codón 222, así como en la muestra de bovino con EEB (Figura 16A).

En los tres caprinos con genotipo Q222Q la intensidad de PrP^{Sc} fue similar, sobre todo en los animales C4 y C6. Los animales K222K presentaron una intensidad más baja de PrP^{Sc} comparada con la observada en los animales Q222Q y en el bovino. Con el anticuerpo P4 también se observó el mismo patrón de glicosilación que con el anticuerpo 6H4, no obstante, con intensidad más baja en las muestras de los cinco caprinos, además de que el anticuerpo P4 no fue capaz de detectar la EEB en la muestra del bovino, como ya ha sido descrito en otros estudios anteriores (Figura 16B).

Figura 16: Western Blot de obex de caprinos Q222Q y K222K inoculados con EEB bovina, un bovino con EEB y un control negativo, con los anticuerpos 6H4 (A) y P4 (B).



Comparando por Western Blot con el anticuerpo 6H4 los caprinos con EEB bovina con distintos polimorfismos en el codón 222 y caprinos con EEB caprina portadores del polimorfismo G127S, con los caprinos inoculados con EEB caprina de segundo pase en cabra pertenecientes al proyecto anterior y con el control de EEB en bovino se observó un patrón de glicosilación muy similar entre los distintos grupos, con presencia de las tres bandas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada (Figura 17).

Las muestras de obex de las cabras presentaron una diferencia en relación a la intensidad de señal de las bandas, sobre todo de la banda diglicosilada. La mayor señal fue observada en los caprinos C4 y C6, portadores del genotipo Q222Q inoculados con EEB bovina. Los animales C5 (Q222Q) y el caprino C3 (Q222Q/G127S) presentaron una señal más baja que las anteriores. Los cuatro caprinos Q222Q con EEB caprina presentaron señal en el Western Blot muy similar entre ellos, seguidos de un animal K222K también con EEB caprina y de otro K222K con EEB bovina (C8). Los caprinos Q222K, el otro animal K222K con EEB caprina y el animal Q222Q/G127S (C2) mostraron baja señal, siendo el animal portador del genotipo G127S el que tenía la menor señal.

Con el anticuerpo P4 el animal que mostró mayor señal fue el C2, con el polimorfismo Q222Q/G127S inoculado con EEB caprina. Los animales K222K con EEB caprina presentaron más señal que los demás, seguidos de los caprinos Q222Q, Q222K y del animal C3 (Q222K/G127S). Los caprinos inoculados con EEB bovina presentaron bandas más leves que los animales con EEB caprina, sobre todo los K222K (Figura 18).

Figura 17: Resultados del Western blot con el anticuerpo 6H4 de las muestras de obex de caprinos con distintos polimorfismos en el codón 222 y en el codón 127 inoculados con EEB bovina y EEB caprina, así como una muestra de EEB en bóvido y un control negativo.

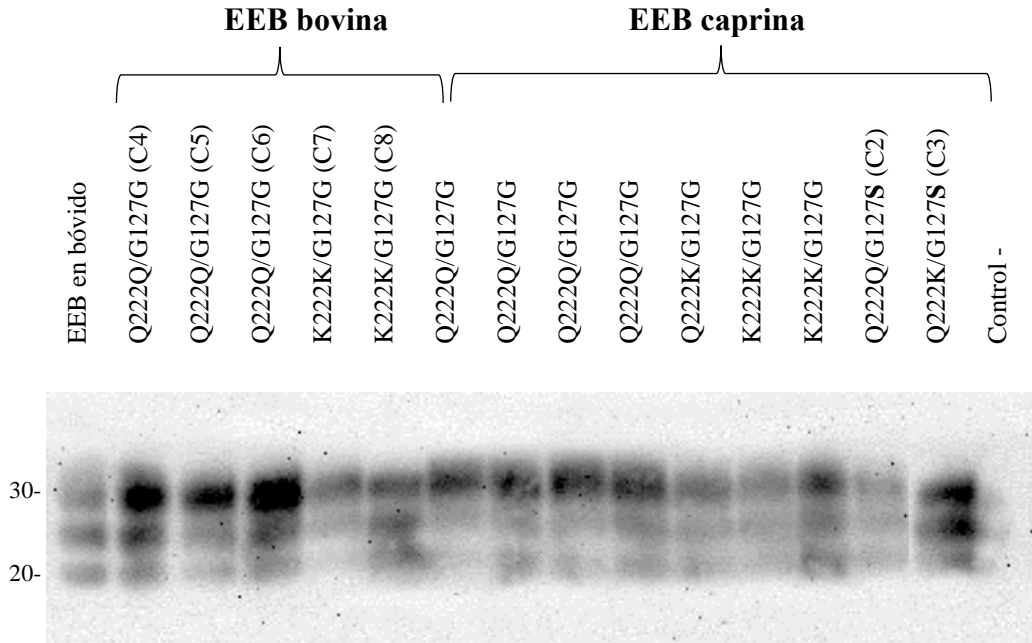
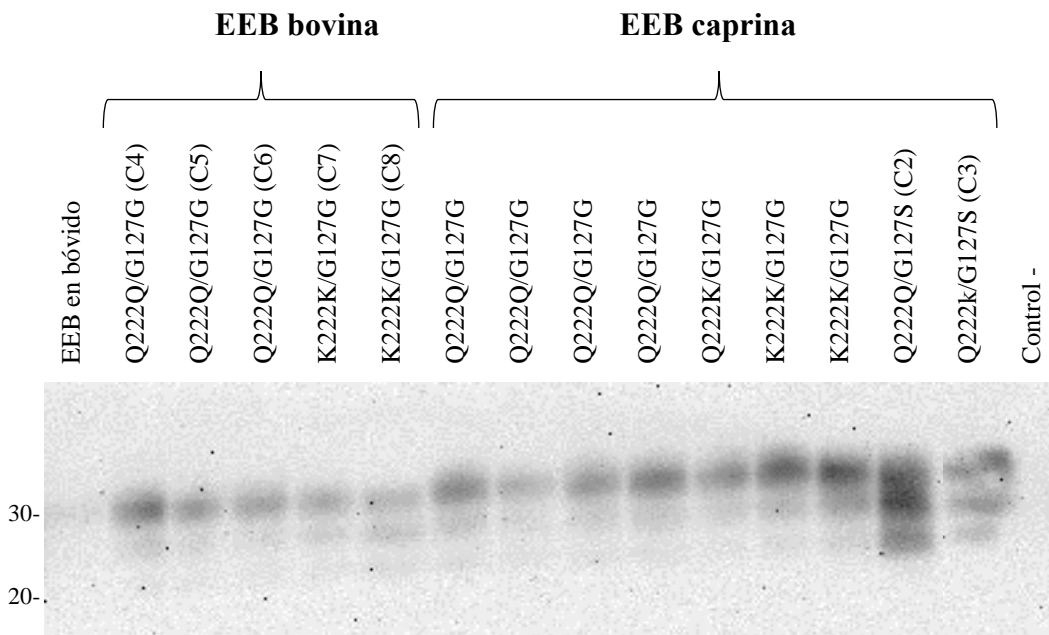


Figura 18: Resultados del Western Blot con el anticuerpo P4 de las muestras de obex de caprinos con distintos polimorfismos en el codón 222 y en el codón 127 inoculados con EEB bovina y EEB caprina, así como una muestra de EEB en bóvido y un control negativo.



3.3.8 Bioensayo

Los ratones transgénicos inoculados con los tejidos caprinos no mostraron signos clínicos de la enfermedad y tampoco alcanzaron la edad establecida para el sacrificio sin que haber desarrollado clínica, 650 días post inoculación (Tabla 10).

Tabla 12: Genotipo en el codón 222 y cepa de EEB, inóculos, días post inoculación.

Genotipo y EEB	Inóculo	Días post inoculación
Q222Q (EEB caprina)	encéfalo	209 días
Q222Q (EEB caprina)	músculo semitendinoso	578 días
Q222K (EEB caprina)	encéfalo	276 días
Q222K (EEB caprina)	músculo semitendinoso	609 días
K222K (EEB caprina)	encéfalo	326 días
K222K (EEB caprina)	músculo semitendinoso	529 días
K222K (EEB caprina)	músculo tríceps braquial	70 días
Q222Q (EEB bovina)	encéfalo	209 días
Q222Q (EEB bovina)	músculo semitendinoso	529 días
Q222Q (EEB bovina)	músculo tríceps braquial	188 días
K222K (EEB bovina)	encéfalo	276 días
K222K (EEB bovina)	músculo semitendinoso	370 días
K222K (EEB bovina)	músculo tríceps braquial	70 días
Control negativo	encéfalo	370 días

3.4 DISCUSIÓN

El scrapie en la especie caprina se conoce desde mediados del siglo XX (Chelle, 1942), pero no fue hasta la primera descripción de un caso de EEB caprina en Francia, cuando se suscitó una preocupación real en la salud pública (Eloit *et al.*, 2005). En este contexto, la disponibilidad de datos genéticos en relación con la resistencia a las EET en cabras es de suma importancia, proporcionando una poderosa herramienta adicional en el control de las EET en la especie. Más de 40 polimorfismos con cambio aminoacídico y 17 mutaciones silentes han sido detectados en la especie caprina, y dentro ellos la presencia de lisina en el codón 222, ha sido descrita por distintos investigadores por tener un efecto protector frente al scrapie clásico (Vaccari *et al.*, 2006; Acuttis *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010).

En Italia, la resistencia conferida por esta variante genotípica fue demostrada en un experimento con cabras inoculadas intracerebralmente con scrapie natural, en el que el citado polimorfismo confirió incluso protección total hasta el final del experimento (Acuttis *et al.*, 2012).

En nuestro trabajo, la presencia de lisina en el codón 222 no proporcionó una total resistencia a la EEB bovina pero si aumentó el período de incubación, estando este hallazgo en connivencia con los resultados obtenidos para la EEB caprina, no obstante, con diferencias en cuanto al periodo de incubación. Esta diferencia podría ser debida a la adaptación de la cepa a la especie después del segundo pase en cabras, habiendo adquirido características específicas del agente del scrapie (Pitarch, 2016).

Estudios como el de Lacroux y colaboradores de 2014 refrendan que, por vía oral, el polimorfismo 222K confiere una resistencia muy fuerte al scrapie, no así por vía intracerebral en la que tanto en heterocigosis (QK) como en homocigosis (KK) se puede desarrollar la enfermedad en un porcentaje muy bajo (20%) y con una gran prolongación del periodo de incubación. Sin embargo, en nuestro estudio los animales con ese mismo genotipo mostraron signos clínicos con anterioridad (Tabla 5), lo que sugiere que la cepa bovina posee un efecto más infectivo sobre las cabras K222K que el scrapie.

Aguilar-Calvo y colaboradores (2014) obtuvieron resultados diferentes al inocular distintos aislamientos en líneas de ratones portadoras de las mutaciones Q222 y K222. Así, ratones transgénicos que expresan el alelo de tipo salvaje (Q222) mostraron susceptibilidad total a la infección con scrapie y EEB, mientras que los ratones

transgénicos que expresaban el alelo K222 eran resistentes a todos los aislamientos de EEB bovina y scrapie, siendo susceptibles únicamente al aislado de EEB caprina.

El grupo de investigación de Fast y colaboradores (2017) realizaron un experimento similar al nuestro pero la vía de inoculación utilizada fue la oral. Así, los resultados que obtuvieron demostraron una protección significativa del genotipo Q222K, ya que ningún animal mostró clínica durante todo el experimento y sólo en dos se pudo demostrar la enfermedad con carácter preclínico. Aguilar-Calvo y colaboradores (2015), en caprinos Q222Q y Q222K inoculados por vía oral con EEB caprina de primer pase, observaron signos clínicos a los 24 meses post inoculación en los animales homocigotos glutamina y ninguna de las cabras heterocigotas glutamina/lisina mostraron signos de la enfermedad siendo confirmadas como negativas mediante inmunohistoquímica, Western blot y PTA-blot. En nuestro estudio los animales K222K con EEB bovina presentaron signos clínicos a los 47 y 32 meses post inoculación, no obstante, hay que tener en cuenta que los animales fueron inoculados por vía intracerebral y que ésta, además de no ser la vía natural de infección, es la más efectiva para la transmisión y para la rápida diseminación del prion.

En cuanto a los dos animales heterocigotos serina/glicina para el codón 127, el periodo de incubación fue casi el doble de la media de las cabras homocigotas K222K inoculadas con EEB caprina de nuestro estudio y similar al de cabras heterocigotas Q222K inoculadas con EEB por vía oral de Aguilar-Calvo y colaboradores (2015). Por ello, este polimorfismo podría jugar un papel protector frente a la EEB caprina pero sin conferir una protección total frente a la enfermedad. Este hallazgo corrobora lo descrito por Goldman *et al.* (2011) que sugiere que el polimorfismo S127 tiene el efecto de prolongar la aparición de la clínica y el periodo de incubación pero no tiene un efecto completamente protector (Dassanayake *et al.*, 2015).

Un factor que puede influir en el periodo de incubación y diseminación del prion es la edad a la que los animales son inoculados. En los estudios de infección experimental, los animales se suelen inocular muy jóvenes, debido a que los folículos linfoides presentes en el intestino involucionan con la edad (Sisó *et al.*, 2009), y este hecho puede tener un efecto sobre la susceptibilidad a la infección después de la exposición oral. Brown y colaboradores (2012) también sugieren que hay efectos del envejecimiento en la microarquitectura y en la función de la zona marginal del bazo, que pueden influir significativamente en la patogénesis de las EET. Se han realizado estudios con el fin de cuantificar el número de folículos linfoides y el área de superficie de las placas de Peyer

en ovino (St. Rose *et al.*, 2007). Y así, se ha demostrado que alrededor de la pubertad (8-9 meses de edad) disminuye la densidad folicular y el área de superficie de las placas de Peyer y que se conservan bajas durante la edad adulta (St. Rose *et al.*, 2007). En corderos de distintas edades inoculados con EEB se comprueba claramente que los grupos de los corderos más jóvenes son los que tienen la incidencia más alta de enfermedad clínica (Hunter *et al.*, 2012). Los animales K222K de este estudio se inocularon con más de 800 días de edad, por la dificultad de obtener animales jóvenes con este genotipo. No obstante, la inoculación se hizo por vía intracerebral y hasta el momento no hay indicios de que la edad influya en la diseminación del prion por esta vía. La baja positividad en los tejidos linfoides del animal C8 (K222K), podría sugerir que la edad de inoculación influyó en la diseminación de la PrP^{Sc} en tejidos linfoides, sin embargo, el otro animal del mismo genotipo evidenció la presencia del agente causal en estos tejidos.

Los caprinos de este estudio han mostrado signos clínicos similares a los observados en otros estudios en los que se ha realizado la inoculación de EEB caprina o scrapie por vía oral. Destacan el prurito, las lesiones de piel, el estado mental deprimido, la ataxia, la debilidad, las posturas anormales y el déficit de propiocepción (Konold *et al.*, 2010; Acutis *et al.*, 2012). Los signos clínicos también fueron similares a los observados en estudios sobre scrapie en la especie ovina (D'Angelo *et al.*, 2007). La evolución de la enfermedad fue rápida, con una media de 62 días de duración de los signos clínicos en los caprinos Q222Q y 87 días en los K222K, sin embargo, fue más prolongada que en los animales con EEB caprina, que se sacrificaron apenas un mes después del comienzo de la clínica, con excepción de un caprino Q222K, que fue sacrificado tres meses después (Pitarch, 2016). Los animales G127S presentaron una prolongación del periodo de signos clínicos lo que podría demostrar que este polimorfismo aumenta el periodo clínico.

El perfil de vacuolización observado parece estar correlacionado con el grado de acumulación de PrP^{Sc}, siendo los núcleos más afectados el caudado, el lenticular, la cápsula externa de los ganglios basales y el tálamo dorsal y ventral de la zona talámica. De esta manera cuanto mayor ha sido la magnitud del depósito de PrP^{Sc}, mayores han sido los valores de la vacuolización, hecho también descrito por Begara-McGorum y colaboradores (2002) en muestras de ovejas con scrapie. Además, el patrón predominante de vacuolización en el neurópilo de los animales Q222Q y en el pericarión de las neuronas en los K222K sugiere que este patrón puede verse influenciado por el genotipo de los animales, factor que ya se tuvo en cuenta en el fenotipo de vacuolización en ovejas infectadas con scrapie (Begara-McGorum *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002).

El patrón de acumulación de la PrP^{Sc} en cabras parece mantenerse constante entre los caprinos portadores de las distintas mutaciones en el codón 222 inoculados intracerebralmente con EEB bovina. Así, estos animales presentan una distribución neuroanatómica similar, a excepción del animal C7 que presentó un perfil distinto que será indicado más adelante.

Las diferencias observadas entre los distintos genotipos fueron únicamente con respecto a la magnitud de depósito de PrP^{Sc}, siendo menor en los animales K222 y mayor en los Q222. Así se detectaron tipos similares de agregados y distribución topográfica, pero con diferencias de magnitud. Este mismo hallazgo se ha demostrado para la EEB caprina (Pitarch, 2016), o para el scrapie (González *et al.*, 2005; Sisó *et al.*, 2006; Jeffrey *et al.*, 2006b) dependiendo del genotipo del huésped y la vía de inoculación.

El patrón tipo se ha caracterizado por inmunomarcaje granular intracelular de moderado a alto en neuronas y células de la microglia y depósitos moderados en el neuropilo en forma de agregados de PrP^{Sc} con patrón particulado fino y lineal. Los depósitos estrellado y lineal fueron similares a los descritos en estudios anteriores de EEB en pequeños rumiantes, sobre todo el marcaje lineal en la sustancia negra del mesencéfalo (Gonzalez *et al.*, 2005; Jeffrey *et al.*, 2006b; Dustan *et al.*, 2008). En las células de Purkinje el marcaje fue de baja intensidad y observado en pocas células, como también fue descrito en un estudio anterior (Jeffrey *et al.*, 2006b).

El animal C7, portador del genotipo KK, presentó un perfil de acumulación distinto ya que no se observó PrP^{Sc} ni en corteza frontal ni en ganglios basales, y un depósito extremadamente bajo, caracterizado únicamente por un punteado fino y leve, sobre todo intraneuronal, en el tálamo. Por la técnica de diagnóstico rápido no se observó positividad en ninguna de las tres áreas; no obstante, el valor para la muestra de tálamo fue próximo al valor de corte, lo que podría indicar una cantidad muy baja de PrP^{Sc} en la misma. Este patrón sugiere que la vía de diseminación del prión en este animal fue distinta a la de los otros caprinos, y que podría haber sido hematogena. La diseminación hematogena del agente infeccioso se ha considerado en algunos modelos experimentales de EET como una posible vía que contribuye a la neuroinvasión (van Keulen *et al.*, 2002; Beekes *et al.*, 2007), aunque la existencia de la barrera hematoencefálica se ha utilizado generalmente como un argumento en contra de esta posibilidad. No obstante, se ha demostrado que los oligómeros de la proteína priónica del scrapie murino pueden cruzar la barrera hematoencefálica intacta y entrar en el líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral (Banks *et al.*, 2004). También se debe considerar que la barrera hematoencefálica

está ausente en algunos puntos específicos del SNC, como en los plexos coroideos y en los órganos circunventriculares, que se localizan alrededor del tercer y cuarto ventrículos (Sisó *et al.*, 2009). En el animal C7 el punto de inoculación podría haber sido distinto al de los demás caprinos, coincidiendo con el área de los órganos circunventriculares, lo que justificaría el distinto patrón de depósito de PrP^{Sc}, que no se observó en las áreas más craneales del encéfalo, además de que en las áreas afectadas tampoco se apreció un depósito muy intenso. Sisó y colaboradores (2009) sugieren que los órganos circunventriculares actúan como punto de entrada de la infección en el encéfalo y contribuyen a la propagación de la infectividad; en este caprino estas estructuras pueden haber contribuido a la diseminación del prión en el sentido inverso.

Respecto a los resultados oculares, se observó PrP^{Sc} en el ojo de todos los caprinos estudiados, concretamente en las capas plexiforme interna y externa y en las células ganglionares de la retina, lo que había sido descrito ya previamente en ovejas (Hortells *et al.*, 2006) y en cabras con scrapie natural (Valdez *et al.*, 2003). Las altas cantidades de PrP^{Sc} observadas en la retina pueden estar asociadas con la abundante expresión de PrP^C en las capas plexiformes interna y externa, así como en las células ganglionares y en las capas de fibras nerviosas de la retina (Frig *et al.*, 2006).

La detección de PrP^{Sc} en tejidos y órganos periféricos demostró una proliferación centrífuga del prión, como ya había sido descrito anteriormente (Kimberlin *et al.*, 1983). En casi todos los caprinos se identificó PrP^{Sc} en los tejidos linfoides, con excepción del animal C2 (Q222Q/G127S) que presentó el período de incubación más largo y por tanto un período de supervivencia mayor que los caprinos inoculados con EEB caprina. En este animal la PrP^{Sc} se limitó al sistema nervioso central, no ocurriendo diseminación centrífuga como se pudo observar en los demás caprinos. En contraste, en muestras de tejido linfoide de otro animal portador del polimorfismo G127S y Q222K, se observó PrP^{Sc} en casi todos los linfonodos analizados mediante IHQ y en bazo por ELISA, así como en muestras de intestino, en las neuronas del sistema nervioso entérico y en tejido linfoide (Tabla 8). En el estudio de Fast y colaboradores (2017), no fueron capaces de detectar PrP^{Sc} en el sistema linforreticular de caprinos Q222K inoculados con EEB (Fast *et al.*, 2017), sin embargo, en nuestro estudio, este polimorfismo vinculado al polimorfismo G127S si se ha podido identificar. Lo que podría sugerir la potenciación infectiva de la EEB cuando los dos polimorfismos cuando se detectan de forma conjunta. La presencia del polimorfismo Q222Q solo podría suponer una mayor susceptibilidad a

las ETT, pero en combinación con el polimorfismo G127S aportaría una mayor resistencia a estas enfermedades y una menor capacidad de diseminación del prión.

En los tejidos linfoides del animal C7, además del depósito de PrP^{Sc} en el centro germinativo de los folículos se observó la Prp^{Sc} en las áreas subcortical, peritrabecular y en el manto, en consonancia a lo observado por Ersdal *et al.* (2005) en ovejas inoculadas con scrapie mediante una sonda gástrica en rumen o abomaso. En nuestro estudio se ha descrito el depósito de PrP^{Sc} en los senos peritrabeculares y subcapsular del linfonodo retrofaringeo y también en algunas células de la área interfolicular y en los senos medulares del linfonodo yeyunal. Ryder *et al.* (2009) mediante un estudio realizado con corderos jóvenes inoculados con scrapie sugieren que algunos de los inmunomarcajes observados en las células de los senos subcapsulares podrían ser células dendríticas, que se transportaron por la linfa y que podrían estar involucradas en transporte del prión dentro del huésped. El caprino K222K también presentó acumulo de PrP^{Sc} en el área marginal de los folículos linfoides del bazo, al igual que se ha descrito en ovejas inoculadas por vía oral con EEB (Andreoletti *et al.*, 2006; van Keulen *et al.*, 2008; Ryder *et al.*, 2009), teniendo estas áreas gran cantidad de macrófagos que fagocitan antígenos (Aichele *et al.*, 2003; Junt *et al.*, 2008). La zona subcapsular y médular de los ganglios linfáticos son responsables de filtrar los patógenos de la linfa y la zona marginal del bazo filtra los patógenos de la sangre (Junt *et al.*, 2008), lo que refuerza la teoría de que en este animal la diseminación del prión pudo ocurrir sobre todo por vía hematogena, ya demostrada como vía útil de transmisión para la EEB y el scrapie (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002; Sisó *et al.*, 2006), apoyando la hipótesis de que la circulación hematogena y linfática pueden ser las principales vías de diseminación del prion.

La ausencia de PrP^{Sc} en el tercer párpado y en muestras de recto, enfatiza la falta de fiabilidad del uso de biopsias de estos tejidos para el diagnóstico preclínico realizado en condiciones experimentales, tal y como se publicó anteriormente en el caso de scrapie en cabras (Acutis *et al.*, 2012).

A nivel muscular, la PrP^{Sc} se detectó en el músculo tríceps braquial del animal C3 (Q222K/G127S), concretamente a nivel de los husos y fascículos nerviosos, tal y como describieron Fast y colaboradores (2017), que detectaron PrP^{Sc} en los husos nerviosos del músculo psoas mayor. Igualmente, en cabras inoculadas con EEB caprina se ha identificado la presencia del prión en las muestras de músculo tríceps braquial y músculo semitendinoso (Pitarch, 2016), lo que refuerza la teoría de la adaptación de la cepa a la especie receptora y que la misma posee mayor grado de infección que la EEB bovina.

En el músculo exocular se observó positividad en todos los animales inoculados, al igual que ya había sido descrito en cabras infectadas de forma natural con scrapie (González *et al.*, 2010). La glándula adrenal no ha mostrado grandes positividades, observándose sólo en un animal (Tabla 9) mediante ELISA y en otro mediante IHQ, concretamente en las células cromafines como fuera ya descrito en ovejas y cabras con scrapie (Acín *et al.*, 2013; Garza *et al.*, 2014). González *et al.*, 2010 también describen la presencia de PrP^{Sc} en la medular de la glándula adrenal de cabras con scrapie.

Comparando las dos técnicas de diagnóstico empleadas, IHQ y ELISA, se ha observado mayor sensibilidad en la técnica de IHQ, identificándose más muestras positivas, sobre todo en el tracto gastrointestinal. El test rápido está puesto a punto y validado para su utilización en muestras de origen nervioso y de origen linfóide, y la dificultad en la homogeneización de órganos como intestinos, pudo influir en la sensibilidad de la técnica, dando lugar a una mala digestión del tejido con la consiguiente falta de exposición de la PrP^{Sc} al anticuerpo. El tallado de distintas partes de un órgano para IHQ y para ELISA, así como la presencia de PrP^{Sc} en baja cantidad y en estructuras muy específicas del tejido, también puede explicar las diferencias entre los resultados de ambas técnicas.

La positividad identificada en muestras de linfonodos tras la repetición de la técnica de ELISA por duplicado evidencia que aunque la técnica y el Kit estén estandarizados para tejidos linfoides puede haber de fallos en el diagnóstico (Tabla 8). En relación a las muestras no nerviosas ni linfoides, otros estudios modificaron algunos parámetros del protocolo recomendado por lo que podrían haber aumentado la sensibilidad de la técnica en estos casos (Everest *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2010), además de establecer un valor de corte para estos tejidos con el objetivo de adecuar la técnica de ELISA a los mismos (Everest *et al.*, 2011; Garza *et al.*, 2014).

Estudios previos han demostrado que la EEB ovina se puede distinguir del scrapie natural y experimental por los diferentes perfiles inmunohistoquímicos debido al mapeo de epítomos y la identificación de los distintos tipos celulares específicos en el SNC y SLR. Los casos clínicos y algunos casos preclínicos de EEB en ovejas, se pueden distinguir de los casos de scrapie por su asociación con cantidades comparativamente reducidas de marcaje de epítomos de PrP^{Sc} en la secuencia de aminoácidos 84-105 dentro del citoplasma de neuronas y células fagocíticas (Jeffrey *et al.*, 2006c). En este estudio se utilizó el anticuerpo C-terminal L42, que demostró un marcaje intenso intraneuronal e intraglial de los agregados de PrP^{Sc} en todos los animales, en contraste, con el anticuerpo

N-terminal P4 que demostró un punteado muy leve, fino y difuso intra y extracelular (Jeffrey *et al.*, 2001). Otros estudios con ovejas inoculadas con EEB no identificaron marcaje intraneuronal ni intra-microglial con el anticuerpo N-terminal (Martin *et al.*, 2005; Sisó *et al.*, 2006; Jeffrey *et al.*, 2006b).

Mediante la técnica de Western Blot en óbex, el anticuerpo 6H4 mostró mayor intensidad de señal en las muestras de los animales Q222Q con EEB bovina, corroborando con los resultados obtenidos en la IHQ. Con el anticuerpo P4 la muestra de EEB bovina no mostró reducida su señal en todas las muestras analizadas, tal y como indican estudios previos de la EEB bovina en ovejas y cabras (Stack *et al.*, 2002; Thuring *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2009), incluso en el animal Q222Q/G127S (C2) en el que se identificó una señal más alta que la observada con el anticuerpo 6H4. Comparando las muestras de caprinos inoculados con EEB bovina y EEB caprina con el anticuerpo P4, se observó una mayor intensidad en las muestras de EEB caprina, lo que podría haber ocurrido por una adaptación de la cepa a la especie caprina.

Los ratones transgénicos inoculados con los tejidos caprinos no han mostrado signos clínicos de la enfermedad y tampoco han alcanzado la edad prevista para el sacrificio sin que haber desarrollado clínica. Padilla y colaboradores (2011) al inocular líneas de ratones humanas, entre ellas la línea Tg340, con distintas cepas de EEB (bovina, ovina y caprina), observó clínica en los ratones inoculados con encéfalo de cabra con EEB a los 695 ± 22 días en seis de los siete animales, lo que sostiene que los ratones de este estudio aún no hayan desarrollado signos clínicos. Además, hay que tener en cuenta que se inocularon animales tanto con muestras de músculo que contenían bajas cantidades del príon como con muestras negativas por las técnicas convencionales de diagnóstico, de esta manera es posible que los ratones de este estudio no desarrollen la enfermedad en un primer pase y se hagan necesarios pases seriados. Los resultados de Padilla *et al.* (2011) respaldan que un pase intermedio del agente de la EEB en pequeños rumiantes acelera la aparición de la enfermedad de vCJD en ratones PrP humanos o aumenta considerablemente su eficacia de transmisión. Estos resultados motivan a continuar estudiando los posibles efectos de la EEB en pequeños rumiantes sobre la especie humana.

De las EET que afectan a las cabras, la EEB es la que representa un mayor riesgo para los humanos, debido a su naturaleza zoonótica. Es bien sabido que esta enfermedad está casi erradicada y bien controlada en bovinos, pero:

- La aparición de la EEB en cabras de forma natural,

- La susceptibilidad de los pequeños rumiantes a la EEB experimental,
- Los posibles diagnósticos erróneos antes de que la vigilancia de EEB se extendiera a estas especies,

hace que sea necesario continuar con la investigación en esta área y por supuesto identificar las posibles combinaciones polimórficas que minimicen la susceptibilidad de las cabras a las EET, y así, poder crear un programa de cría fiable que ofrezca protección frente a las tres enfermedades: scrapie, EEB bovina y EEB caprina.

Con este estudio podemos concluir que el alelo K222 prolonga los períodos de incubación, pero no confiere una completa resistencia frente a la EEB ovina y caprina inoculada por vía intracerebral, en contraste a los estudios previos realizados en scrapie clásico. No obstante, esta protección sugiere que un programa de mejora de la resistencia frente a las EET, basado en la selección de portadores del alelo K222, podría prevenir eficientemente la infección por la encefalopatía espongiforme bovina. Por otro lado, nuestros resultados muestran una dispersión de la PrP^{Sc} fuera del SNC, independientemente del genotipo, habiendo alcanzado los husos nerviosos y fascículos nerviosos del músculo tríceps braquial, lo que podría representar un riesgo para la seguridad alimentaria.

ESTUDIO II
POLIMORFISMOS EN EL GEN *PRNP*.
SELECCIÓN DE CAPRINOS RESISTENTES A LAS EET

4. ESTUDIO II: POLIMORFISMOS EN EL GEN *PRNP*. SELECCIÓN DE CAPRINOS RESISTENTES A LAS EET

4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades fatales, neurodegenerativas causadas por la acumulación de una isoforma anormal de una proteína celular (PrP^C), llamada príon (PrP^{Sc}), en el sistema nervioso central sistema (SNC) (Prusiner, 1982). La especie caprina puede verse afectada por el scrapie y por la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) de forma natural (Eloit *et al.*, 2005; Jeffrey *et al.*, 2006b; Spiropoulos *et al.*, 2011).

El papel que los polimorfismos del gen *PRNP*, responsable de codificar la proteína celular PrP^C (Oesch *et al.*, 1985), ejerce sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles es bien conocido. Los diferentes polimorfismos pueden influir en la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} haciendo que el individuo sea más susceptible o resistente a estas enfermedades (Bossers *et al.*, 1997). Diversos estudios del gen *PRNP* caprino han mostrado 17 mutaciones silentes y más de 40 sustituciones aminoacídicas (Serrano *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010; Goldmann *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011; Papasavva-Stylianou *et al.*, 2011; Acín *et al.*, 2013), de las cuales al menos ocho parecen estar asociadas con la resistencia al scrapie: G127S, I142M, H143R, S146N / S146D, R154H, R211Q y Q222K.

Experimentos recientes han demostrado que los polimorfismos R211Q y Q222K extienden el período de incubación e incluso protegen frente a las dos enfermedades que afectan a las cabras (White *et al.*, 2012; Lacroux *et al.*, 2014; Aguilar-Calvo *et al.*, 2015), habiéndose encontrado previamente ambas mutaciones en razas caprinas españolas (Acín *et al.*, 2013). Así, es interesante seguir estudiando las posibles mutaciones en el gen *PRNP* en cabras españolas y la frecuencia de alelos resistentes, para definir el estado de riesgo de la población y seleccionar machos con alto valor genético para futuros reproductores. De esta manera, el objetivo de este trabajo es realizar un estudio del gen *PRNP* de la raza Moncaína como raza caprina autóctona de España, con el fin de establecer la frecuencia alélica de los polimorfismos que favorecen la resistencia frente a las EET.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Muestras de sangre

Para este estudio se han genotipado 1721 muestras de sangre de cabras de la raza española Moncaína procedentes de distintos rebaños de la zona del Moncayo (Aragón), y de Borobia, perteneciente a provincia de Soria (Castilla y León) (Tabla).

Tabla 13: Localización de muestreo de la cabra Moncaína.

Localización	Localización
Aranda del Moncayo	Mesones de Isuela
Arándiga	Nuévalos
Borobia (Soria)	Pomer
Brea de Aragón	Ricla
Clares de Ribota	Sestrica
Épila	Tierga
Illueca	Torrelepaja
Jarque del Moncayo	Trasobares

4.2.2 Extracción del ADN

Las muestras de sangre fueron sometidas a técnica de extracción de ADN mediante el Kit QIAGEN® (QIAamp DNA mini kit), según el protocolo del fabricante. Este protocolo consiste básicamente en una digestión de 10 minutos con proteinasa K (20 ng/ml) a 56°C, precipitación con etanol, ciclos de lavado para eliminar los residuos y recuperación del ADN (Anexo 4).

4.2.3 Amplificación y secuenciación del ADN

La amplificación del fragmento ORF (open reading frame) del gen *PRNP* se realizó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) con el Kit QIAGEN® (HotStarTaq® Master Mix Kit) y los cebadores PrP8 y PrP9 (Tabla 14)

(Bossers *et al.*, 1996) (Anexo 5). La reacción de PCR se purificó utilizando el colector de vacío de Millipore® y se realizó una secuenciación bidireccional utilizando los mismos cebadores de la PCR. Los cromatogramas se analizaron mediante los programas BioEdit v.4.8.6 y Chromas v.2.4.1. (Hall, 1999).

Tabla 14: Cebadores PrP8 y PrP9 utilizados para la técnica de PCR.

Gene	Cebador para PCR	
PRNP	Forward	PrP8: 5' - CAGGTTAACGATGGTGAAAAGCCACATAGG -3'
	Reverse	PrP9: 5' - GGAATTCTATCCTACTATGAGAAAAATGAGG -3'

4.3 RESULTADOS

En las muestras genotipadas se identificaron doce polimorfismos distintos: diez sustituciones aminoácidicas en los codones G37V, M137I, R139S, I142M, R154H, Q171R, R211Q, Q215R, Q222K y P240S; y dos mutaciones silentes en los codones 42 (ccg-cca) y 138 (agt-agg), todas ellas descritas previamente. Considerando únicamente los polimorfismos con cambios de aminoácidos, se observaron doce haplotipos (Tabla 15) y 41 genotipos (Tabla 16).

Tabla 15: Frecuencia haplotípicas observadas en la raza Moncaína.

Hap.	37	137	139	142	154	171	211	215	222	240	Frecuencia
1	G	M	R	I	R	Q	R	Q	Q	S	10.08* - 12.78*
2	G	M	R	I	R	Q	R	Q	Q	P	41.31* - 44.02*
3	V	M	R	I	R	Q	R	Q	Q	S	0.30
4	G	I	R	I	R	Q	R	Q	Q	P	0.35
5	G	M	S	I	R	Q	R	Q	Q	P	0.058
6	G	M	R	M	R	Q	R	Q	Q	P	16.00
7	G	M	R	I	H	Q	R	Q	Q	S	2.00* - 4.70*
8	G	M	R	I	H	Q	R	Q	Q	P	9.04* - 10.05*
9	G	M	R	I	R	R	R	Q	Q	P	0.029
10	G	M	R	I	R	Q	Q	Q	Q	S	15.49
11	G	M	R	I	R	Q	R	R	Q	P	0.61
12	G	M	R	I	R	Q	R	Q	K	S	1.02

Hap.: Haplotipo; G: glicina; M: metionina; R: arginina; I: isoleucina; S: serina; M: metionina; H: histidina; Q: glutamina; K: lisina; P: prolina; * Depende de la segregación.

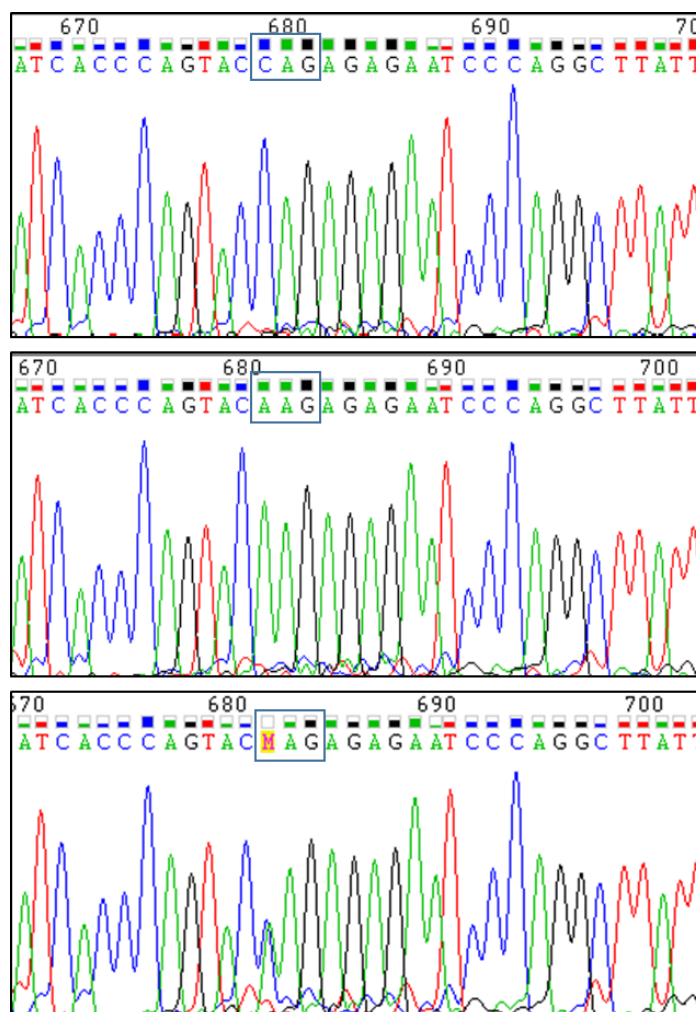
De las distintas mutaciones en el codón 222 (tema del estudio I) (Figura 19), el genotipo heterocigoto glutamina/lisina (Q222K) se observó en 31 caprinos, el homocigoto lisina únicamente en un macho de una explotación de Tierga, y el genotipo ancestral Q222Q, en los demás animales.

Tabla 16: Frecuencias genotípicas observadas en la raza Moncaína

Genotipo		Frecuencia	
1/1	S240/S240	31	1.80%
1/2	S240/P240	106	6.16%
2/2	P240/P240	417	24.2%
3/1	V37S240/G37S240	1	0.06%
3/2	V37S240/G37P240	5	0.29%
4/1	I137P240/M137S240	2	0.12%
4/2	I137P240/M137P240	8	0.46%
5/1	S139P240/R139S240	1	0.06%
5/2	S139P240/R139P240	1	0.06%
6/1	M142P240/I142S240	69	4.00%
6/2	M142P240/I142P240	205	12.0%
6/3	G37M142P240/V37I142S240	2	0.12%
6/4	M137M142P240/I137I142P240	2	0.12%
6/6	M142P240/M142P240	55	3.20%
7/1	H154S240/R154S240	20	1.16%
7/2	H154S240/R154P240	0 – 93*	0 – 5.4*%
7/3	G37H154S240/V37R154S240	0	0.00%
7/6	I142H154S240/M142R154P240	13	0.76%
7/7	H154S240/H154S240	4	0.23%
8/1	H154P240/R154S240	0 – 93*	0 – 5.4*%
8/2	H154P240/R154P240	74	4.30%
8/6	I142H154P240/M142R154P240	33	1.92%
8/7	H154P240/H154S240	14	0.08%
8/8	H154P240/H154P240	35	2.03%
9/6	I142R171P240/M142Q171P240	1	0.06%
10/1	Q211S240/R211S240	83	4.82%
10/2	Q211S240/R211P240	156	9.10%
10/3	G37Q211S240/V37R211S240	2	0.12%
10/6	I142Q211S240/M142R211P240	100	5.81%
10/7	R154Q211S240/H154R211S240	14	0.81%
10/8	R154Q211S240/H154R211P240	62	3.60%
10/10	Q211S240/Q211S240	58	3.37%
11/1	R215P240/Q215S240	3	0.17%
11/2	R215P240/Q215P240	6	0.35%
11/3	G37R215P240/V37Q215S240	0	0.00%
11/6	I142R215P240/M142Q215P240	10	0.58%
11/10	R211R215P240/Q211Q215S240	0	0.00%
11/11	R215P240/R215P240	1	0.06%
12/2	K222S240/Q222P240	27	1.57%
12/6	I142K222S240/M142Q222P240	6	0.35%
12/12	K222S240/K222S240	1	0.06%

G: glicina; M: metionina; R: arginina; I: isoleucina; S: serina; M: metionina; H: histidina; Q: glutamina; K: lisina; P: prolina; * Depende de la segregación.

Figura 19: Distintos genotipos en el codón 222. A: homocigoto glutamina (Q222Q), B: homocigoto lisina (K222K), C: heterocigoto glutamina/lisina Q222K).



4.4 DISCUSIÓN

En la literatura existen diversos estudios que analizan el gen *PRNP* caprino, y en todos ellos se demuestra que posee una gran variabilidad polimórfica. Así mismo, algunas variaciones se asocian a un menor riesgo de desarrollar el scrapie clásico, como por ejemplo I142M, N146D, S146D, R211Q y Q222K (Goldmann *et al.*, 1996; Acutis *et al.*, 2006; Vaccari *et al.*, 2006; Papasavva-Stylianou *et al.*, 2007; González *et al.*, 2009; Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010; Goldmann *et al.*, 2011; Papasavva-Stylianou *et al.*, 2011).

En este estudio, los haplotipos 1 y 2 fueron los más frecuentes, distinguiéndose solo por el dimorfismo P/S en el codón 240. Aunque el haplotipo 1 se considera la forma ancestral del gen *PRNP* caprino, la variante más frecuente en este estudio fue el haplotipo 2, con un porcentaje de 41.31% frente a 44.02% (dependiendo de la segregación). Este hallazgo ya ha sido observado en otras razas caprinas europeas (Billinis *et al.*, 2002; Acutis *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010; Goldmann *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011; Papasavva-Stylianou *et al.*, 2011; Acin *et al.*, 2013).

Todos los polimorfismos identificados en este estudio se han detectado con anterioridad en la raza Moncaína (Acín *et al.*, 2013), a excepción del polimorfismo Q171R, identificado únicamente en una hembra y cuya primera descripción en la literatura fue en una cabra de la raza Helénica (Bouzalas *et al.*, 2010). Es interesante observar que esta mutación da lugar a un alelo asociado con una alta resistencia frente al scrapie clásico en ovejas: A136R154R171 (Dawson *et al.*, 1998).

Varios experimentos asocian los polimorfismos en los codones 142, 154, 211, 222 y 240, observados en este estudio, con la susceptibilidad a la infección natural de scrapie. Según algunos trabajos, la presencia de metionina en el codón 142 estaría asociada con un nivel de protección limitada (Barillet *et al.*, 2009; Corbiere *et al.*, 2013). Lacroux y colaboradores (2014) describen que el polimorfismo I142M no proporciona una resistencia sustancial a la infección por scrapie tras la inoculación intracerebral u oral. Así mismo, se ha demostrado que caprinos de genotipos I142M y M142M inoculados con EEB bovina intracerebralmente poseen una resistencia parcial a la enfermedad (Fast *et al.*, 2017).

Respecto al polimorfismo H154R, confiere protección relativa cuando se trabaja con scrapie clásico y se inocula por vía oral. No sucede así si el experimento se lleva a cabo por vía intracerebral (Corbiere *et al.*, 2013; Lacroux *et al.*, 2014) o por el contrario

la cepa inoculada es de scrapie atípico (Colussi *et al.*, 2008). Este mayor nivel de susceptibilidad al scrapie atípico representa un argumento importante contra la selección del alelo H154 en poblaciones de cabras.

El polimorfismo R211Q, que se describe como protector frente al scrapie clásico en distintos estudios (Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010), en este, se ha observado en un 24.2% de los animales. Lacroux y colaboradores (2014) describen caprinos portadores de este polimorfismo como resistentes a la infección por scrapie clásico por vía oral, y con moderado incremento en el período de incubación si la inoculación es intracerebral. Sin embargo, Aguilar-Calvo *et al.* (2015) en caprinos inoculados por vía oral con EEB caprina observaron una baja resistencia a la enfermedad de este polimorfismo.

Distintos estudios describen que el polimorfismo Q222K ejerce un papel en la susceptibilidad al scrapie clásico en cabras (Vaccari *et al.*, 2006; Acuttis *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010). En este estudio, el número de animales portadores del polimorfismo Q222K fue muy bajo (1.92%) y únicamente un macho fue homocigoto lisina. Aguilar-Calvo y colaboradores (2014), al inocular líneas de ratones portadoras de las mutaciones Q222 y K222 con distintos aislamientos de EEB observaron que, ratones transgénicos K222 eran resistentes a todos los aislamientos de EEB bovina y scrapie, siendo susceptibles únicamente a la EEB caprina. Otro estudio de inoculación por vía oral de EEB bovina y EEB caprina demostró una significativa protección del genotipo Q222K (Fast *et al.*, 2017). En el estudio I de esta tesis, los animales K222K inoculados con EEB bovina presentaron signos clínicos a los 47 y 32 meses post inoculación, contradiciendo los resultados demostrados por otros trabajos y no mostrando total resistencia a la enfermedad como en el caso del scrapie (Lacroux *et al.*, 2014).

Algunos estudios describen que la presencia de prolina en el codón 240 no está asociada directamente con el riesgo de infección por scrapie (Barillet *et al.*, 2009, Corbiere *et al.*, 2013). Los hallazgos relacionados con el papel que este codón pudiera tener sobre la susceptibilidad a las EEB son controvertidos, ya que, el extremo C-terminal de la PrP^C, que incluye el aminoácido del codón 240, se elimina en un cambio postraduccional (Stahl *et al.*, 1987). Así, no es de esperar que este polimorfismo afecte directamente a la susceptibilidad a la enfermedad.

Las mutaciones silentes en los codones 42 y 138 se encontraron en ligamiento con el dimorfismo en el codón 240, los pares de bases ccg en el codón 42 y agt en el codón 138 están ligadas al alelo P240, mientras que cca en el codón 42 y agc en el codón 138

están ligadas al alelo S240, corroborando lo observado en estudios previos (Goldmann *et al.*, 1996; Kurosaki *et al.*, 2005; Acutis *et al.*, 2006; Babar *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2009).

Un estudio en Francia realizado en cabras de las razas Saanen y Alpina demostró ocho polimorfismos en el fragmento ORF del gen *PRNP*, y en ellos dos mutaciones silentes en los codones 42 y 138 y seis con sustitución aminoacídica, G127S, I142M, R154H, R211Q, Q222K y S240P (Barillet *et al.*, 2009). De estos polimorfismos únicamente el G127S no fue observado en el presente estudio. Corbiere *et al.* (2013) también describen las mutaciones I142M, R154H, R211Q, Q222K y S240P en cabras francesas, demostrando que hay una similitud entre los genotipos de las cabras de España y Francia.

Este estudio confirma la alta variabilidad genética del gen *PRNP* de la raza Moncaína, y describe la presencia de algunos polimorfismos referidos anteriormente como resistentes a las EET, como los polimorfismos R211Q y Q222K. Sin embargo, las frecuencias de estos haplotipos son relativamente bajas, lo que demuestra la necesidad de mantener y reproducir los animales para aumentar la frecuencia y consecuente resistencia genética de los rebaños. La presencia de polimorfismos resistentes implica la posibilidad de llevar a cabo una selección genética del gen *PRNP* sin cruzar los animales con otras razas y así mantener la pureza de la raza Moncaína.

ESTUDIO III

**Distintos factores genéticos que pueden influir en la
susceptibilidad o resistencia a las EET**

5. ESTUDIO III – Distintos factores genéticos que pueden influir en la susceptibilidad o resistencia a las EET

5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La familia de genes que codifican las proteínas priónicas en mamíferos está formada por tres genes conocidos: *PRNP* que codifica la proteína prion (PrP), *SPRN* que codifica la proteína shadoo (Sho) y *PRND* que codifica la proteína doppel (Dpl) (Premzl *et al.*, 2003, Premzl y Gamulin, 2007; Watts y Westaway, 2007). La PrP y la Sho se expresan de manera mayoritaria en la neuronas del SNC (Hu *et al.*, 2007, Watts *et al.*, 2007), mientras que la Dpl parece ser específica del aparato reproductor (Genoud *et al.*, 2003).

En la mayor parte de las especies afectadas por las enfermedades priónicas, la susceptibilidad y la patogénesis están moduladas por el gen *PRNP*. En los animales de las especies ovina y caprina, el control de la enfermedad está ligado de manera compleja a genotipos específicos. Sin embargo, no todas las ovejas con el mismo genotipo en el gen *PRNP* son igualmente susceptibles o desarrollan la patología de la misma manera (Goldmann, 2008), lo que puede sugerir la participación de otros genes.

En este estudio se plantea la hipótesis de que el gen *SPRN* y la proteína Sho puedan estar implicados en estas enfermedades, proponiendo que Sho y PrP se unen al mismo receptor celular en su papel neuroprotector y que la alteración en la expresión de Sho, en las enfermedades priónicas, aumenta la muerte neuronal (Watts *et al.*, 2007). Algunos estudios se han centrado en valorar la asociación entre los polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP* y la susceptibilidad y el tiempo de incubación de las EET en bovinos. Curiosamente, en la región no codificadora del gen *PRNP* bovino, Sander *et al.* (2004) se ha revelado una asociación entre la susceptibilidad a la EEB y un polimorfismo de inserción / deleción (indel) de 23 pb en la región promotora y un polimorfismo indel de 12 pb en el Intron I.

Suponiendo que Sho tiene un papel en las enfermedades priónicas, así como que el polimorfismo indel en la región promotora del gen *PRNP* influye en la susceptibilidad a la EEB en el ganado bovino, es posible que puedan contribuir también en la susceptibilidad o patogénesis de las EET en otras especies. De esta manera, este estudio tiene como objetivo analizar los polimorfismos en el gen *SPRN* de ciervos de la especie

cervus elaphus (ciervo rojo), y en cabras de la raza Alpina así como analizar los polimorfismos de la región promotora del gen *PRNP* en el ciervo rojo europeo.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 Muestras de ADN

Para el estudio se utilizaron 66 muestras de ciervos de la especie Ciervo Rojo (*Cervus elaphus*), 30 obtenidas a partir de la extracción de ADN de muestras de bazo de animales de España y 35 muestras de ADN de sangre de ciervos del Reino Unido. Además, se utilizaron muestras de 25 cabras de la raza Alpina.

5.2.2 Extracción del ADN

Las muestras de sangre de las 15 cabras fueron sometidas a la técnica de extracción de ADN mediante el Kit QIAGEN® (QIAamp DNA mini kit), según el protocolo del fabricante. Este protocolo consiste básicamente en una digestión de 10 minutos con proteinasa K (20 ng/ml) a 56°C, precipitación con etanol, ciclos de lavado para eliminar los residuos y recuperación del ADN. Las muestras de bazo de los ciervos de España se sometieron al mismo protocolo de extracción de ADN de sangre, no obstante, con dos digestiones a 56°C con proteinasa K (Anexo 4).

5.2.3 Técnica de PCR y secuenciación del gen *SPRN*

La amplificación del fragmento de marco abierto de lectura (ORF) del gen *SPRN* (Anexo 6) se realizó en muestras de 91 animales (66 ciervos y 25 cabras) mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) con la Master Mix AmpliTaq Gold® 360 y el 360 GC Enhancer. Los cebadores utilizados en las muestras de ciervos fueron: forward 5'-AACTGGGCGGCCCGCCGTGTGC - 3' y reverse 5'-GGCTGGGTAGCCTCTAAGGTGGC - 3', y para las muestras de caprinos: forward 5'-AACTGGGCGGCCCGCCGTGTGC - 3' y reverse 5'-CAGGAGGTGTCACAGCTTCAGGG - 3'. La reacción de PCR se purificó utilizando carbón activado y la secuenciación se realizó con el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix y con el cebador 5' - CTCTGCTGCTAGCGGCCACC

- 3` para las dos especies. Los cromatogramas se analizaron mediante el programa Chromas v.2.4.1. (Hall, 1999).

5.2.4 Técnica de PCR y secuenciación de la región promotora del gen *PRNP*

La amplificación del fragmento ORF de la región promotora del gen *PRNP* se realizó con muestras de ADN de 65 ciervos, mediante la técnica de PCR con la Master Mix AmpliTaq Gold® 360 (Anexo 7). Los cebadores utilizados en las muestras de ciervos fueron: forward 5` - GAACTGAGTAAATGACGGCAGGTGA - 3` y reverse 5` - CCAATTCCGCGTCTCCTCTGGGCAT - 3`. La reacción de PCR se purificó utilizando carbón activado y la secuenciación se realizó con el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix y con el cebador 5` - GCTAATATCCTTTCTAGGCCTC - 3` para las. Los cromatogramas se analizaron mediante el programa Chromas v.2.4.1. (Hall, 1999) y las posiciones de pares de bases se establecieron con referencia al GenBank EU082256.1.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Gen *SPRN*

En las muestras de sangre de los ciervos, en el fragmento ORF se identificaron tres mutaciones con cambio aminoacídico en los codones 67, 88, y 98; y siete mutaciones silentes en los codones 50, 60, 68, 77, 114, 130 y 136. Además de tres mutaciones en el fragmento 3'UTR (Tabla 17).

Tabla 17: Frecuencia de los genotipos y alelos encontrados en el gen *SPRN* de los ciervos.

ORF					
Codón	Posición(pb)	Genotipo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
Mutación con cambio aminoacídico					
67	200	gcg/gcg	64 (96.97%)	gcg (Ala)	96.97 %
		gtg/gtg	2 (3.03%)	gtg (Val)	3.03 %
88	263	gcg/gcg	49 (74.24%)	gcg (Ala)	87.12 %
		gcg/ggg	17 (25.76%)	ggg (Gli)	12.88 %
98	292	ggg/ggg	64 (96.97%)	ggg (Gli)	96.97 %
		agg/agg	2 (3.03%)	agg (Arg)	3.03 %
Mutación silente					
50	150	ccc/ccc	65 (98.48%)	ccc (Pro)	99.24 %
		ccc/cct	1 (1.52%)	cct (Pro)	0.76 %
60	80	gcc/gcc	65 (98.48%)	gcc (Ala)	99.24 %
		gcc/gct	1 (1.52%)	gct (Ala)	0.76 %
68	204	gca/gca	64 (96.97%)	gca (Ala)	96.97 %
		gcg/gcg	2 (3.03%)	gcg (Ala)	3.03 %
77	231	gcg/gcg	63 (95.45%)	gcg (Ala)	97.73 %
		gcg/gca	3 (4.55%)	gca (Ala)	2.27 %
114	342	gcg/gcg	60 (90.90%)	gcg (Ala)	95.45 %
		gcg/gca	6 (9.10%)	gca (Ala)	4.55 %
130	390	ctg/ctg	64 (96.97%)	ctg (Leu)	96.97 %
		ctc/ctc	2 (3.03%)	ctc (Leu)	3.03 %
136	408	ggc/ggc	64 (96.97%)	ggc (Gli)	98.48 %
		ggc/ggt	2 (3.03%)	ggt (Gli)	1.52 %
3'UTR					
	450	CC	55 (83.33%)	C	90.15 %
		CT	9 (13.64%)	T	9.85 %
		TT	2 (3.03%)		
	497	AC	66 (100%)	C A	50% 50%
	500	CC	6 (9.10%)	C	54.55%
		AC	60 (90.90%)	A	45.45%

pb: pares de bases, A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina, Pro: prolina, Ala: alanina, Leu: leucina, Gli: glicina.

Entre los polimorfismos identificados en el fragmento ORF del gen *PRNP* en ciervos, los polimorfismos silentes en los codones 50 y 60 se observaron únicamente en dos caprinos de Reino Unido, un animal con cada polimorfismo. Los polimorfismos con cambio aminoacídico en los codones 67 y 98 se observaron en los mismos animales, así como las mutaciones silentes en los codones 68 y 130. En el codón 77 se observó una mutación silente en 3 caprinos de Reino Unido, al igual que en el codón 136 que se observó mutación únicamente en 2 animales del mismo país. En el codón 88 se identificó una mutación con cambio aminoacídico en 4 animales de Reino Unido y en 12 de España, y en el codón 114 una mutación silente en 4 caprinos de Reino Unido y 2 de España. En el fragmento 3'UTR, 11 ciervos poseían mutación en la posición 450 (C→T), todos los animales mutación en la posición 497 (A→C), y finalmente, en la posición 500, 59 caprinos presentaron la mutación A→C.

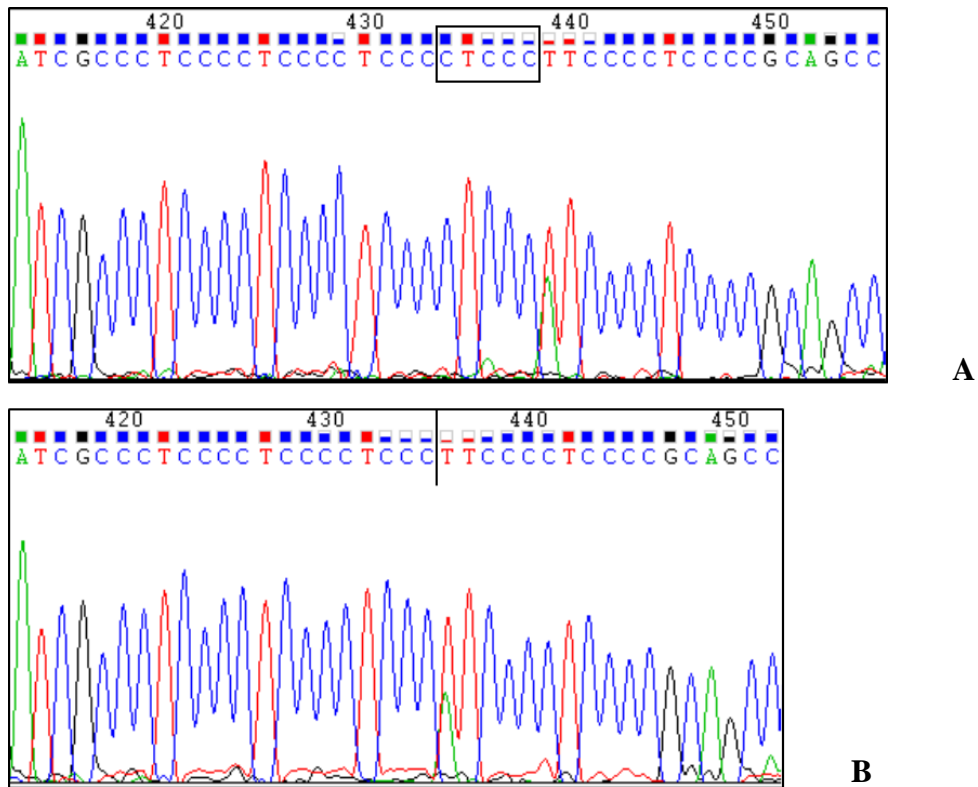
Tabla 18: Frecuencia de los genotipos y alelos observados en el gen *SPRN* caprino.

Codón	Posición (pb)	Genotipo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
ORF					
48	144	ccg/ccg	19 (76%)	ccg (Pro)	84 %
		ccg/cca	4 (16%)	cca (Pro)	16 %
		cca/cca	2 (8%)		
59	177	gcg/gcg	11 (44%)	gcg (Ala)	68 %
		gcg/gcc	12 (48%)	gcc (Ala)	32 %
		gcc/gcc	2 (8%)		
100	300	ccc/ccc	2 (8%)	ccc (Pro)	32 %
		ccc/cct	12 (48%)	cct (Pro)	68 %
		cct/cct	11 (44%)		
145	433	cgg/cgg	24 (96%)	cgg (Arg)	98 %
		cgg/agg	1 (4%)	agg (Arg)	2 %
3'UTR					
	573	GG	24 (96%)	G	98 %
		GA	1 (4%)	A	2 %
	602	del/del	8 (32%)	del.	56 %
		ins/del	12 (48%)	ins.CTCCC	44 %
		ins/ins	5 (20%)		

pb: pares de bases, A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina, Pro: prolina, Ala: alanina, Arg: arginina, Del: delección, Ins: inserción.

En las cabras de la raza Alpina se identificaron cuatro mutaciones silentes en el fragmento OFR en los codones 48, 59, 100 y 145, así como en el fragmento 3`UTR una mutación en la posición 573 (G → A) y una inserción de CTCCC (Figura 20) en la posición 602_606 (Tabla 18). Las mutaciones en los codones 59 (gcg/gcc) y 100 (ccc/cct) se observaron en los mismos animales, y los caprinos portadores de la mutación en el codón 48, también portaban las mutaciones citadas anteriormente. Dos animales portadores del genotipo cca/caa en el codón 48 también poseían el genotipo gcc/gcc en el codón 59.

Figura 20: Fragmento 3`UTR del gen *SPNR*. A: inserción de CTCCC en la posición 602_606. B: delección en la posición 602.

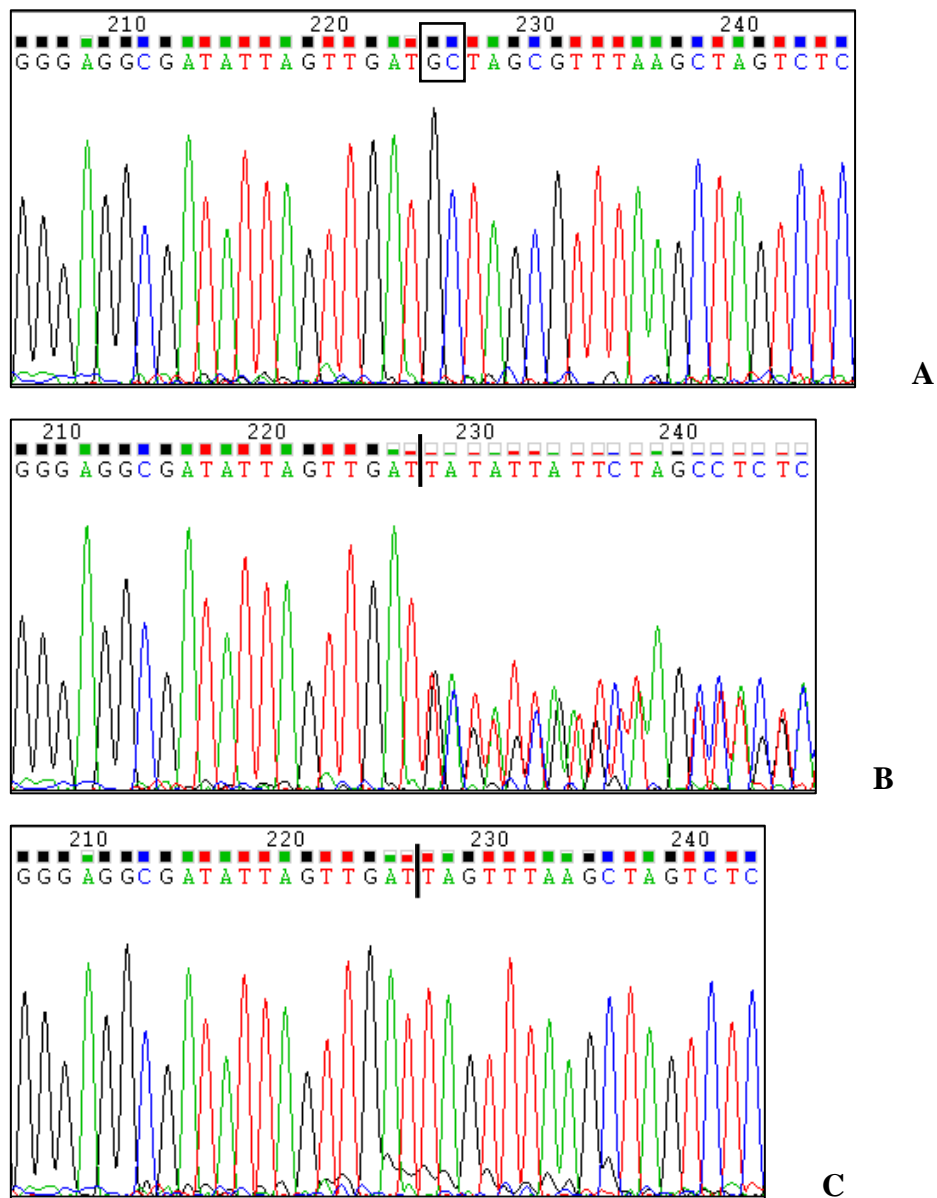


5.3.2 Región promotora del gen *PRNP*

De las 65 muestras secuenciadas, en 33 no fue posible valorar toda la secuencia, debido a que se utilizó únicamente un cebador para secuenciación, en la dirección “Foward”, y la presencia de polimorfismos de inserción/delección imposibilitó la lectura de la secuencia completa (Figura 21). Así diez animales presentaron un polimorfismo en

heterocigosis de Ins./Del. en la posición 2038_2039, 18 en la posición 2268 y 4 en la posición 2272.

Figura 21: Polimorfismo indel en la posición 2038_2039pb. A: Ins./Ins. GC. B: Ins./Del. C: Del/Del.



En las 32 secuencias leídas por completo, 19 de ciervos de España y 13 de Reino Unido, se identificaron polimorfismos en las posiciones: 1911 (G→A), 1946 (G→C), 2002 (G→A), 2038_2039 (ins.GC), 2042_2043 (ins. GC), 2052 (T→C), 2059 (G→C), 2107 (C→G), 2227 (ins. A), 2272 (C→T), 2292 (G→A), 2305 (A→G) con distintas frecuencias (Tablas 19 y 20).

Tabla 19: Frecuencia de genotipos y alelos observados en la región promotora del gen *PRNP* en 32 muestras de ciervo rojo.

Posición (pb)	Genotipo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia %
1911	GG	30 (93.75%)	G	96.88
	GA	2 (6.25%)	A	3.12
1946	GG	16 (50%)	G	51.56
	CC	15 (46.88%)	C	48.44
	GC	1 (3.12%)		
2002	GG	31(96.88%)	G	96.88
	AA	1 (3.12%)	A	3.12
2038-2039	Ins./Ins	31 (96.88%)	Ins. GC	96.88
	Del./Del	1 (3.12%)	Del.	3.12
2042-2043	Ins./Ins	31 (96.88%)	Ins. GC	96.88
	Del./Del	1 (3.12%)	Del.	3.12
2052	TT	26 (81.25%)	T	87.5
	CC	2 (6.25%)	C	12.5
	TC	4 (12.50%)		
2059	GG	25 (78.13%)	G	78.13
	CC	7 (21.87%)	C	21.87
2107	CC	31 (96.88%)	C	98.44
	CG	1 (3.12%)	G	1.56
2227	Del./Del	31 (96.88%)	Del.	96.88
	Ins./Ins	1 (3.12%)	Ins. A	3.12
2272	CC	30 (93.75%)	C	96.88
	CT	2 (6.25%)	T	3.12
2292	GG	27 (84.38%)	G	89.06
	AA	2 (6.25%)	A	10.94
	GA	3 (9.37%)		
2305	GG	24 (75%)	G	79.69
	AA	5 (15.63%)	A	20.31
	AG	3 (9.37%)		

pb: pares de bases, A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina, Pro: prolina, Ala: alanina, Arg: arginina, Del: delección, Ins: inserción.

Tabla 20: Genotipos y frecuencias observados en la región promotora del gen *PRNP* según el origen de los ciervos.

Posición (pb)	España	Frecuencia	Reino Unido	Frecuencia
1911	GG	19 (100%)	GG GA	11 (84.62%) 2 (15.38%)
1946	GG GC CC	13 (68.42%) 1 (5.26%) 5 (26.32%)	GG CC	3 (23.08%) 10 (76.92%)
2002	GG	19 (100%)	GG AA	12 (92.31%) 1 (7.69%)
2038-2039 (GC)	Ins./Ins.	19 (100%)	Ins./Ins. Del./Del.	12 (92.31%) 1 (7.69%)
2042-2043 (GC)	Ins./Ins.	19 (100%)	Ins./Ins. Del./Del.	12 (92.31%) 1 (7.69%)
2052	TT CC	17 (89.47%) 2 (10.53%)	TT TC	9 (69.23%) 4 (30.77%)
2059	CC GG	7 (36.84%) 12 (63.16%)	GG	13 (100%)
2107	GG GC	18 (94.74%) 1 (5.26%)	GG	13 (100%)
2227	Ins./Ins. Del./Del.	13 (68.42) 6 (31.58%)	Del./Del.	13 (100%)
2272	CC CT	17 (89.47%) 2 (10.53%)	CC	13 (100%)
2292	GG AA	17 (89.47%) 2 (10.53%)	GG GA	10 (76.92%) 3 (23.08%)
2305	GG AA	17 (89.47%) 2 (10.53%)	GG AA GA	7 (53.84%) 3 (23.08%) 3 (23.08%)

pb: pares de bases, A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina, Pro: prolina, Ala: alanina, Arg: arginina, Del: delección, Ins: inserción.

5.4 DISCUSIÓN

El papel de la proteína Sho en la patogénesis de las EET fue sugerido por primera vez por Watts y colaboradores (2007), que observaron una reducción drástica de la proteína en encéfalos de ratones infectados con PrP^{Sc}. Posteriores estudios han demostrado que las mutaciones en el fragmento ORF del gen *SPRN* podrían ser un factor de potencial riesgo en la patogénesis de las EET. Así, Beck y colaboradores (2008) asociaron la aparición de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob con una mutación en el gen *SPRN*. Concretamente, con una inserción de un par de bases en el codón 46 y otra mutación en el codón 7 (T7M) asociándolo a la aparición de casos esporádicos de la enfermedad.

Considerando que se ha demostrado en humanos que la variación genética del gen *SPRN* se asocia con la aparición de enfermedades priónicas, es importante establecer si dicha asociación también ocurre en las enfermedades priónicas animales, principalmente en el scrapie en ovejas y cabras, y la enfermedad crónica caquetizante en los ciervos. Para esto, es útil explorar la extensión y el tipo de variación genética del fragmento ORF del gen *SPRN* en rumiantes. En ovejas, la región hidrofóbica homóloga a PrP de Sho es polimórfica y un polimorfismo indel detectado en esta región, que produce la inserción/delección de dos residuos de alanina, se ha asociado con la susceptibilidad al scrapie clásico (Lampo *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en Italia con cabras, se identificaron polimorfismos en el gen *SPRN* caprino en los codones 48G→A, 59G→C, 61G→C, 100T→C, 145C→A y cuatro polimorfismos en el fragmento 3'UTR (posiciones 573G→A, 602_606insCTCCC, 624G→T, 645G→T) (Pelleto *et al.*, 2012). En nuestro estudio, los polimorfismos se han observado en los codones 48, 59, 100 y 145, así como las posiciones 573 (G → A), 602_606ins.CTCCC y 645 (G → T) del fragmento 3'UTR, corroborando los resultados de Pelleto y colaboradores (2012) y también los observados por Stewart y colaboradores (2009), que en muestras de 135 caprinos de distintas razas y orígenes, describen las cuatro mutaciones silentes del presente estudio. Además, el polimorfismo indel (602_606ins.CTCCC), asociado por Pelleto y colaboradores (2012) con el scrapie clásico en cabras, se ha observado con una alta frecuencia alélica, 44%, y en homocigosis en el 20% de los animales.

Tampoco se conoce bien la influencia que los polimorfismos en el gen *SPRN* puedan tener sobre la susceptibilidad de los ciervos al CWD, pero en cualquier caso es

importante conocer la variabilidad genética de este gen en esta especie. En nuestro estudio se ha observado una mayor variabilidad genética que la descrita por Stewart *et al.* (2009). En su trabajo, se identificaron dos polimorfismos con cambio aminoacídicos (G29S and R45H) y cuatro mutaciones silentes (150C→G, 231G→A, 390G→C y 408C→T); en el presente trabajo además de las cuatro mutaciones silentes descritas su han detectado tres polimorfismos con cambio aminoácido en los codones 67, 88 y 98 y tres mutaciones silentes en los codones 60, 68 y 114.

Diversos estudios describen que distintos polimorfismos en el gen *PRNP* en diferentes especies de mamíferos se asocian con la susceptibilidad a las EET, sin embargo, en el ganado vacuno, ningún de los polimorfismos conocidos dentro del fragmento OFR del gen posee una gran influencia en la susceptibilidad a la EEB. Curiosamente, en la región no codificadora del gen *PRNP* bovino, Sander y colaboradores (2004) revelaron una asociación entre la susceptibilidad a la EEB y un polimorfismo de inserción / deleción de 23 pb en la región promotora del gen y un polimorfismo indel de 12 pb en la región Intron I.

Tras esta observación, desde 2004 varios estudios se ha centrado en valorar las asociaciones entre polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP* y la susceptibilidad y el tiempo de incubación de las EET en bovinos de distintos países como: en Alemania (Sander *et al.*, 2004, Sander *et al.*, 2005), en el Reino Unido (Juling *et al.*, 2006), en Polonia (Gurgul *et al.*, 2012) y en China (Hu *et al.*, 2013). Según Sander y colaboradores (2005) un polimorfismo de Del/Del de 23 pb en la región promotora elimina un sitio de unión para el factor de transcripción RP58 y un polimorfismo indel de 12 pb en la región Intron I, elimina un sitio de unión para el factor de transcripción SP1. De esta manera, las variantes de inserción de cualquier de los elementos reguladores tienen el potencial de reducir los niveles de expresión de la proteína prión, proporcionando así una base biológica para la resistencia a la EEB en bovinos con polimorfismo de inserción en homocigosis (Juling *et al.*, 2006). Diversos estudios con búfalos identificaron un mayor número de alelos de inserción en la región promotora e Intron I del gen *PRNP*, lo que podría justificar porque el búfalo parece ser más resistente a la EEB que los bóvidos (Zhao *et al.*, 2015; Yaman *et al.*, 2017).

Haase y colaboradores (2007) describen resultados que corroboran los estudios citados anteriormente, sin embargo, también refieren que existen diferencias específicas de raza que deben tenerse en cuenta al analizar dichos datos. Además de que se ha

demostrado que polimorfismos en esta región influyen únicamente en la EEB clásica, no teniendo un efecto sobre la EEB atípica (Brunelle *et al.*, 2007).

En otras especies casi no hay estudios ni publicaciones sobre polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP*. De esta manera, este estudio fue uno de los primeros en valorar los polimorfismos en esta región en la especie del ciervo rojo (*Cervus elaphus*), observándose una gran variedad genética, describiéndose nueve polimorfismos de un solo nucleótido y tres polimorfismos indel.

Los estudios de asociación genética con las EET son notoriamente difíciles debido a la dificultad de controlar factores como: los periodos de incubación, las distintas cepas, las infecciones subclínicas y la posible influencia genética del gen *PRNP*. Por lo tanto, no hay pruebas sustanciales que confirmen una asociación entre polimorfismos en el gen *SPRN* con la susceptibilidad a las EET animales, ni que no pueda modular otros aspectos de la enfermedad, como la patología o la infección subclínica. Así como tampoco hay estudios que comprueben que polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP* puedan influir en la susceptibilidad a las encefalopatías espongiformes transmisibles de otras especies además de en los bóvidos. De esta manera es de suma importancia seguir estudiando posibles polimorfismos en el gen *SPRN* y en otras regiones del gen *PRNP*, con el objetivo de valorar si otros factores, además de los polimorfismos en el marco de lectura abierto del gen *PRNP*, pueden influir en la susceptibilidad a este grupo de enfermedades.

DISCUSIÓN GENERAL

6. DISCUSIÓN GENERAL

El agente causal del scrapie, de la EEB y de las demás EET, es una proteína anómala (PrP^{Sc}) que se forma mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) presente en el hospedador de forma natural. Esta conversión depende de la cadena de aminoácidos que componen la proteína, y por lo tanto, de la secuencia nucleotídica del gen responsable de codificarla: el gen *PRNP* (Hunter, 1997). Así, la presencia de determinados polimorfismos en el marco de lectura de dicho gen pueden dar lugar a un cambio aminoacídico en dominios críticos de la PrP^C, pudiendo influir de esta manera en la conversión a la isoforma patógena, dificultando o favoreciendo el cambio conformacional (Bossers *et al.*, 1997). Diversos estudios han demostrado que el gen *PRNP* ovino influye en la susceptibilidad al scrapie en la especie ovina, además de que también puede tener efecto en la patogenia de la enfermedad.

Con la identificación del primer caso de EEB en cabra (Eliot *et al.*, 2005) se trabajó activamente en adoptar medidas de prevención contra la enfermedad en la especie caprina, y en ellas la búsqueda de polimorfismos en el gen *PRNP* que pudiesen estar asociados con la susceptibilidad a las EET. Estudios realizados con cabras de distintos países demuestran evidencias de que la presencia del alelo K222 confiere resistencia frente al scrapie (Vaccari *et al.*, 2006; Acuttis *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010; Acuttis *et al.*, 2012) y la frente a la EEB (Aguilar-Calvo *et al.*, 2014) en esta especie. En el **estudio I** del presente trabajo se inocularon cabras de distintos genotipos para el codón 222, animales homocigotos glutamina (Q222Q) y homocigotos lisina (K222K), con EEB bovina; además de dos caprinos portadores de los polimorfismos Q222Q y Q222K, y heterocigotos glicina/serina en el codón 127, inoculados con EEB caprina. Todos los caprinos murieron a causa de la enfermedad, aunque no obstante con periodos de incubación distintos en función del genotipo para este codón. Este hallazgo, también fue descrito por Lacroux y colaboradores (2014), pero para la enfermedad de scrapie y mediante inoculación intracerebral. En nuestro trabajo, los animales con serina/glicina en el codón 127 presentaron los mayores periodos incubación, lo que sugiere que ese polimorfismo podría jugar un papel protector frente a la EEB caprina. No obstante, Goldmann *et al.* (2011) sugieren que el polimorfismo S127 tiene el efecto de retrasar la clínica en el scrapie o prolongar del período de incubación en esta misma

enfermedad, pero no un efecto protector sobre la enfermedad en sí, como también han descrito Dassanayake y colaboradores (2015).

En el SNC de las cabras el depósito de PrP^{Sc} se caracterizó por un inmunomarcaje intracelular importante, tanto en neuronas como en células de la microglia y también se pudo apreciar un depósito moderado de PrP^{Sc} en el neuropilo. Los depósitos subependimal y subpial, en general, fueron leves y variables, no detectándose en todos los animales. Sin embargo, los depósitos estrellado y lineal mostraron el mismo comportamiento que en estudios anteriores de EEB en pequeños rumiantes, sobre todo el marcaje lineal en la sustancia negra del mesencéfalo (Gonzalez *et al.*, 2005; Jeffrey *et al.*, 2006; Dustan *et al.*, 2008). En tejidos y órganos, mediante el análisis por IHQ y ELISA, se observó distribución de la PrP^{Sc} en el SLR de casi todos los animales, a excepción del animal Q222Q/G127S; así como en neuronas del plexo mioenterico del sistema nervioso periférico del intestino de algunos caprinos analizados. En el caprino Q222K/G127S inoculado con EEB caprina, se identificó PrP^{Sc} en husos y fascículos nerviosos del musculo tríceps braquial, siendo el músculo uno de los principales tejidos que forman parte de la cadena alimentaria del ser humano. Como complemento a este trabajo, se está llevando a cabo un estudio de bioensayo en ratones transgénicos con el fin de comprobar la infectividad de todos los tejidos recogidos en el presente experimento.

Mediante el uso de diferentes anticuerpos por inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot, es posible diferenciar la EEB bovina del scrapie en ovejas. En este trabajo, el uso del anticuerpo C-terminal P4 en la IHQ ha mostrado una tinción intraneuronal muy leve y difusa en muestras de sistema nervioso central. Estudios previos (Jeffrey *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005; Jeffrey *et al.*, 2006) describen la ausencia de un marcaje intraneuronal con el mismo anticuerpo. Con la técnica de Western Blot, también utilizando el anticuerpo P4, se ha observado marcaje de la PrP^{Sc}, como ocurre en el scrapie y no en la EEB bovina (Stack *et al.*, 2002; Thuring *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005). Esto sugiere que el agente de la EEB ha podido ir adoptando características diferentes al de la cepa original en la especie bovina y a su vez similares al del scrapie. Estos datos indican que el uso de las técnicas de diagnóstico con distintos anticuerpos se puede utilizar como un método para distinguir los casos de EEB y de scrapie.

La posibilidad de que determinados genotipos en el gen *PRNP* influyan en la susceptibilidad a las EET en cabras, motivó la realización del **estudio II**, en el que se llevó a cabo un análisis del gen *PRNP* de la raza caprina autóctona española Moncaína. En este estudio se analizaron las frecuencias alélicas del gen *PRNP* en la raza con el fin

de encontrar animales portadores de polimorfismos resistentes y proponer un programa de cría de los mismos, aumentando así la resistencia de rebaños frente a las EET. Se analizaron 1.721 muestras de ADN y los resultados demostraron la presencia del alelo Q211 con una frecuencia del 15%, además de encontrar 15 animales heterocigotos Q/K222 y un homocigoto K/K222, todos ellos en el mismo rebaño. Por último, se encontró un animal portador del polimorfismo Q171R, descrito únicamente en un estudio (Bouzalas *et al.*, 2010). El polimorfismo S127, observado en dos caprinos del estudio I, no se identificó en ningún animal, a pesar de que ha sido anteriormente descrito en la raza Moncaína (Acin *et al.*, 2013).

En la mayor parte de las especies afectadas por las enfermedades priónicas, la susceptibilidad y la patogénesis están moduladas por el gen *PRNP*, no obstante, por ejemplo, no todas las ovejas con el mismo genotipo en el gen *PRNP* son igualmente susceptibles o desarrollan la patología de la misma manera (Goldmann, 2008), lo que sugiere la participación de otros genes. Por ello se realizó el **estudio III** con el objetivo de valorar posibles polimorfismos que pudieran estar presentes en el gen *SPRN* en muestras de ciervos de la especie ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y de cabras de la raza Alpina. El motivo es que, polimorfismos de inserción/delección en la región promotora del gen *PRNP* se han descrito como factores influyentes en la susceptibilidad a la EEB en la especie bovina (Sander *et al.*, 2004; Sander *et al.*, 2005).

En el gen *SPRN* de las cabras, se observaron polimorfismos en los codones 48, 59, 100 y 145, así como las posiciones 573 (G → A), 602_606ins.CTCCC y 645 (G → T) del fragmento 3`UTR, corroborando con los resultados de Pelleto *et al.* (2012) y también con los observados por Stewart *et al.* (2009). En ciervos, no se conoce bien la influencia de los polimorfismos en el gen *SPRN*, no obstante, se observó una alta variabilidad genética en la especie, con siete mutaciones silentes, cuatro también descritas por Stewart *et al.* (2009) y tres polimorfismos con cambio aminoácido en los codones 67, 88 y 98. En la región promotora del gen *PRNP* en la especie bovina, diversos estudios describen la influencia del polimorfismo de delección de 23pb (Sander *et al.*, 2004; Sander *et al.*, 2005; Juling *et al.*, 2006; Gurgul *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). En otras especies casi no se dispone de datos sobre los polimorfismos en la región promotora del gen *PRNP*. De esta manera, este estudio fue uno de los primeros a en valorar los polimorfismos en esta región en la especie del ciervo rojo (*Cervus elaphus*), observándose una gran variedad genética, y describiéndose nueve polimorfismos de un solo nucleótido y tres polimorfismos indel.

Los estudios de asociación genética con las EET son notoriamente difíciles debido a la dificultad de controlar factores como los periodos de incubación, las distintas cepas, las infecciones subclínicas y la posible influencia genética del gene *PRNP*. De esta manera es de suma importancia seguir estudiando posibles polimorfismos en el gen *SPRN* y en otras regiones del gen *PRNP*, con el objetivo de valorar si otros factores, además de los polimorfismos en el marco de lectura abierto del gen *PRNP*, pueden influir en la susceptibilidad a este grupo de enfermedades.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En la especie caprina, el polimorfismo (Q→K) en el codón 222 del gen *PRNP* prolonga el periodo de incubación de la EEB bovina la tras inoculación intracerebral, lo que indica que este polimorfismo confiere una resistencia parcial a la EEB.
2. El polimorfismo (G→S) en el codón 127 confiere una prolongación del periodo de incubación en caprinos inoculados intracerebralmente con EEB caprina, siendo éste superior que para el polimorfismo (Q→K) del codón 222.
3. El patrón de depósito de la PrP^{Sc} en las cabras K222K inoculado con EEB bovina sugiere una diseminación hematogena de la proteína prión.
4. La distribución de la PrP^{Sc} en el organismo de los animales, tras la inoculación intracerebral, se realiza de forma centrífuga, detectándose la proteína prión en órganos linfoides y otros órganos no nerviosos
5. La presencia de PrP^{Sc} en los husos y fascículos nerviosos del músculo se hizo patente en las cabras inoculadas con la EEB caprina, demostrándose una adaptación de la cepa a la especie y suponiendo un riesgo para la seguridad alimentaria.
6. La raza caprina española Moncaína posee una alta variabilidad del gen *PRNP*, con presencia de polimorfismos resistentes a scrapie y EEB (R154H, R211Q y Q222K) y por tanto puede ser considerada como una buena reproductora para seleccionar animales resistentes a las EEB.
7. Las cabras de la raza Alpina presentaron un polimorfismo indel en el gen *SPRN* considerado como favorecedor de la susceptibilidad al scrapie.
8. La alta variedad genética observada en el gen *SPRN* y en la región promotora del gen *PRNP* en la especie *Cervus Elaphus* demuestra la posibilidad de que puedan ser un factor de influencia sobre la susceptibilidad a la enfermedad crónica caquetizante en esta especie.

CONCLUSIONS

7.1 CONCLUSIONS

1. In goats, the polymorphism (Q→K) at codon 222 of the *PRNP* gene extends the incubation period of bovine BSE after intracerebral challenge, what means this polymorphism confers partial resistance to BSE.
2. The polymorphism (G→S) at codon 127 extends the incubation period in goats inoculated intracerebrally with caprine BSE, being longer than for the polymorphism (Q→K) for codon 222.
3. The phenotype of the PrP^{Sc} in the K222K goats inoculated with bovine BSE suggests a hematogenous spread of the prion protein pathogenesis.
4. The organic distribution of PrP^{Sc} after intracerebral inoculation was distributed in a centrifugal way, detecting the prion protein in lymphoid and other non-neural tissues.
5. The presence of PrP^{Sc} in the nervous spindles and nerve fascicles of the muscle was evident in the goats inoculated with caprine BSE, demonstrating an adaptation of the strain to the species and posing a possible risk to food safety.
6. The native Spanish goat breed Moncaína has a high variability of the *PRNP* gene, with the presence of resistant polymorphisms against scrapie and BSE (R154H, R211Q and Q222K) and therefore it can be considered as a good breeder to select TSE-resistant animals.
7. The Alpina breed presented an indel polymorphism in the *SPRN* gene considered as increasing susceptibility to scrapie.
8. The high genetic variety observed in the *SPRN* gene and in the promoter region of the *PRNP* gene in the *Cervus Elaphus* species demonstrates the possibility that they could be a factor of influence on the susceptibility or resistance to Chronic wasting disease in this species.

RESUMEN

8. RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles afectan tanto a la especie humana como a los animales, y se caracterizan por un largo período de incubación y lesiones neurodegenerativas que conducen a la muerte del individuo. Estas enfermedades están causadas por el acumulo de una proteína anómala (PrP^{Sc}), sobre todo en el SNC, que se genera mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) que está presente en el hospedador de forma natural. La PrP^{Sc} es capaz de inducir la transformación de la PrP^C en PrP^{Sc}, y esta conversión depende de la cadena de aminoácidos que componen la proteína, y por ello de la secuencia nucleotídica del gen que la codifica, el *PRNP*. De esta manera, la presencia de determinados polimorfismos en el marco de lectura abierto de este gen puede dar lugar a un cambio aminoacídico en dominios críticos de la PrP^C, pudiendo influir en la conversión a la PrP^{Sc}. Sin embargo, no todos los animales con el mismo genotipo en el gen *PRNP* son igualmente susceptibles o desarrollan la patología de la misma manera, lo que puede sugerir la participación de otros genes.

Debido a la demostrada influencia de los factores genéticos sobre las EET, en esta tesis se realizaron tres estudios con el objetivo común de contribuir a un mejor conocimiento de los aspectos genéticos en las encefalopatías espongiformes transmisibles en rumiantes y por lo tanto de su patogenia.

La influencia del gen *PRNP* se ha estudiado ampliamente en la especie ovina, pero tras el diagnóstico de una cabra infectada de forma natural con EEB, se implementaron los estudios en la especie caprina. De esta manera, un gran número de cabras europeas fueron genotipadas y se encontraron determinados polimorfismos que podrían ser útiles a la hora de elaborar un programa de selección genética similar al del ovino. El análisis de este gen ha dado lugar a la descripción de más de 40 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico y de 17 mutaciones silentes en esta especie. Además, diversos estudios realizados en cabras infectadas de forma natural y experimentalmente con el agente del scrapie han demostrado la capacidad de determinados polimorfismos para modular la susceptibilidad o resistencia de sus portadores a padecer la enfermedad. En el caso de la EEB, pocos estudios han abordado la resistencia genética en cabras. Algunos estudios de transmisión oral de EEB a cabras portadoras de las mutaciones R211Q y Q222K, revelan que mientras el primer polimorfismo extiende el período de incubación, solo el alelo K222 parece tener un efecto protector. Este hecho convierte al polimorfismo

Q222K en uno de los principales candidatos para establecer un programa de mejora genética para erradicar las EET en cabras. Por ello, se realizó un primer estudio (Estudio I), en el cual se inoculó el agente de la EEB bovina por vía intracerebral a cabras portadoras de diferentes mutaciones en el codón 222, homocigotas glutamina y homocigotas lisina y dos animales inoculados con EEB caprina (segundo pase en cabra), uno Q222Q y otro heterocigoto Q222K, también portadores del polimorfismo G127S. Independientemente del genotipo en el codón 222, la presencia de PrP^{Sc} en el sistema nervioso central fue similar en todos los animales, a excepción del inoculado con EEB bovina de genotipo K222K, que no presentó PrP^{Sc} en corteza frontal y ganglios basales mediante ELISA y casi insignificante positividad mediante IHQ, lo que sugiere que en este animal el punto de inoculación intracerebral fue distinto al de los otros caprinos. En el sistema linforreticular, el genotipo de los animales tampoco influyó en el depósito de PrP^{Sc}, que no se detectó únicamente en un caprino inoculado con EEB caprina. En sistema nervioso periférico, el prion se identificó en las neuronas del plexo mioenterico del intestino así como en el musculo tríceps braquial, en husos y fascículos nerviosos, del animal Q222K/G127S inoculado con EEB caprina. En cuanto a la caracterización del agente causal, la técnica de inmunohistoquímica reveló que posee características similares a las del agente de la EEB bovina, caracterizado por un punteado muy leve, fino y difuso intraneuronal con el anticuerpo P4 y una señal más baja con el mismo anticuerpo, mediante la técnica de Western Blot.

Con el objetivo de conocer la frecuencia alélica de los polimorfismos resistentes en la población de cabras autóctonas españolas, se realizó un estudio de genotipado con muestras de 1721 animales de la raza Moncaina (Estudio II). Se observó una alta variabilidad genética y se identificó la presencia de algunos polimorfismos descritos por otros estudios como resistentes a las EET, como los polimorfismos R211Q y Q222K. Sin embargo, las frecuencias de estos haplotipos fueron relativamente bajas, lo que demostró la necesidad de mantener y reproducir los animales para aumentar la frecuencia y consecuente resistencia genética de los rebaños.

En la mayor parte de las especies afectadas por las enfermedades priónicas, la susceptibilidad y la patogénesis son moduladas por el gen *PRNP*. En los animales de las especies ovina y caprina, el control de la enfermedad está ligado de manera compleja a genotipos específicos. Sin embargo, no todos los animales con el mismo genotipo en el gen *PRNP* son igualmente susceptibles o desarrollan la patología de la misma manera, lo que puede sugerir la participación de otros genes. Por este motivo, en el último estudio

(Estudio III) se realizó un análisis de los polimorfismos identificados en el gen *SPRN* en ciervos de la especie ciervo rojo (*cervus elaphus*) y cabras de la Raza Alpina, y en la región promotora del gen *PRNP* en muestras de ciervos. No se conoce bien la influencia de los polimorfismos en el gen *SPRN* en ciervos y de los datos que se desprenden de este estudio se observó una alta variabilidad genética, con la presencia de tres polimorfismos con cambio aminoácido y siete mutaciones silentes en el marco de lectura abierto y tres mutaciones en el fragmento 3`UTR. En los caprinos se observó cuatro mutaciones silentes en el fragmento ORF y dos en el 3`UTR, incluyendo un polimorfismo indel (602_606ins.CTCCC) anteriormente relacionado con la susceptibilidad al scrapie clásico. En la región promotora del gen *PRNP* en ciervos también se observó una gran variedad de polimorfismos, nueve de un solo nucleótido y tres de inserción/delección.

Los tres estudios desarrollados en la tesis doctoral cumplieron con los objetivos propuestos, contribuyendo ampliar el conocimiento de los factores genéticos que influyen en las encefalopatías espongiformes transmisibles que afectan a los rumiantes.

SUMMARY

8.1 SUMMARY

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) affect both human and animals, and are characterized by a long incubation period and neurodegenerative lesions that lead to the death of the individual. These diseases are caused by the accumulation of an abnormal protein (PrP^{Sc}), especially in the central nervous system (CNS), which is generated by the conformational conversion of a cell surface glycoprotein (PrP^C) present in the host naturally. PrP^{Sc} is able to induce the transformation of PrP^C into PrP^{Sc}, and this conversion depends on the chain of amino acids defining the protein, and therefore, on the nucleotide sequence of the gene responsible for encoding it, *PRNP*. Therefore, the presence of certain polymorphisms in the open reading frame of this gene may result in an amino acid change in critical domains of PrP^C, which may influence the conversion to PrP^{Sc}. However, not all animals with the same genotype for the *PRNP* gene are equally susceptible or develop the pathology in the same way, which may suggest the participation of other genes.

Due to the demonstrated influence of genetic factors on TSEs, three studies were carried out in this thesis with the common objective of contributing to the knowledge of genetic aspects, and their relationship with pathogenesis, in transmissible spongiform encephalopathies in ruminants.

The influence of the *PRNP* gene has been studied extensively in the ovine species, however, after the diagnosis of a goat naturally infected with BSE, the studies in the goat species were implemented. In this way, a large number of European goats were genotyped and certain polymorphisms that could be useful when developing a genetic selection program similar to that of sheep were found. The analysis of this gene has led to the description of more than 40 mutations involving an amino acid change and 17 silent mutations in this species. In addition, several studies in goats naturally and experimentally infected by scrapie have demonstrated the ability of certain polymorphisms to modulate the susceptibility or resistance of their carriers to the disease. In the case of BSE, few studies have addressed the genetic resistance in goats. Some studies of oral transmission of BSE to goats carrying the mutations R211Q and Q222K, have revealed that while the first polymorphism extends the incubation period, only the K222 allele seems to have a protective effect. This fact makes the Q222K polymorphism one of the main candidates to establish a breeding program to eradicate TSEs in goats. Therefore, a first study was conducted, in which the bovine BSE agent was inoculated intracerebrally in goats

carrying different mutations in codon 222, homozygous glutamine and homozygous lysine. This study also included two animals inoculated with goat BSE (second passage of bovine BSE in goat), one Q222Q and another heterozygote Q222K, also carriers of the G127S polymorphism. Regardless of the genotype at codon 222, the presence of PrP^{Sc} in the CNS was similar in all animals, except for the K222K one inoculated with bovine BSE, which did not present PrP^{Sc} in frontal cortex and corpus striatum by ELISA and almost insignificant positivity by IHC, which suggests that in this animal the point of intracerebral inoculation was different from that of the other goats. In the lymphoreticular system, the genotype of the animals did not influence the deposit of PrP^{Sc}, which only was not detected in a goat inoculated with caprine BSE. In the peripheral nervous system, the prion was identified in the neurons of the myenteric plexus of the intestine as well as in the triceps brachial muscle, in spindles and nervous fascicles, of the animal Q222K / G127S inoculated with caprine BSE. Regarding the characterization of the agent, the IHC technique revealed that caprine BSE has similar characteristics to those of the bovine BSE agent, characterized by a very light, fine and diffuse intraneuronal punctate with the P4 antibody; and a lower signal with the same antibody, using the WB technique.

In order to assess the allelic frequency of resistant polymorphisms in the population of native Spanish goats, a genotyping study was performed with goat samples from 1721 animals of the Moncaína breed (second study). A high genetic variability was observed and the presence of some TSE resistant polymorphisms described by other studies as was identified, such as the R211Q and Q222K polymorphisms. However, the frequencies of these haplotypes are relatively low, which demonstrates the need to maintain and reproduce the animals to increase the frequency and consequent genetic resistance of the herds.

In most of the species affected by prion diseases, susceptibility and pathogenesis are modulated by the *PRNP* gene. In ovine and caprine species, the control of the disease is linked in a complex way to specific genotypes. However, not all animals with the same genotype in the *PRNP* gene are equally susceptible or develop the pathology in the same way, which may suggest the participation of other genes. For this reason, in the last study (third study) an analysis of the polymorphisms identified in the *SPRN* gene was carried out in red deer species (*Cervus elaphus*) and goats of the Alpine breed, and in the promoter region of the *PRNP* gene in deer samples. The influence of the polymorphisms in the *SPRN* gene in deer is not well known, however, a high genetic variability was observed, with the presence of three polymorphisms with amino acid change and seven

silent mutations in the open reading frame and three mutations in the fragment 3`UTR. In goats, four silent mutations were observed in the ORF fragment and two in the 3`UTR, including an indel polymorphism (602_606ins.CTCCC) previously related to susceptibility to classical scrapie. In the promoter region of the *PRNP* gene in deer we also observed a great variety of polymorphisms, nine of a single nucleotide and three of insertion / deletion.

The three studies developed in the doctoral thesis reach the proposed objectives, increasing the knowledge of the genetic factors that influence the transmissible spongiform encephalopathies affecting ruminants.

ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de procesamiento de tejidos y elaboración de cortes histológicos

- Fijación y tallado

1. Introducir la muestra en formol tamponado al 10% en volumen suficiente para que ésta flote libremente en el líquido fijador durante 24 horas.
2. Tallar en una cabina de bioseguridad secciones de aproximadamente 2-3 mm de grosor.
3. Introducir las secciones en casetes y dejarlos fijar en formol tamponado al 10% durante otras 24 horas.

- Procesado del tejido

Deshidratar e incluir el tejido en parafina. A continuación se muestra el protocolo de rutina en el inclusor automático al vacío TP 1050:

Reactivo	Tiempo	Ambiente
Formol 10%	10 min.	Ambiente
Alcohol 70°	2 h	Ambiente
Alcohol 70°	2 h	Ambiente
Alcohol 96°	1 h	Ambiente
Alcohol 96°	1 h	Ambiente
Alcohol 100°	1 h	Ambiente
Alcohol 100°	2 h	Ambiente
Alcohol 100°	2 h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Parafina	1 ½ h	56-60°C
Parafina	1 ½ h	56-60°C
Parafina	1 ½ h	56-60°C

Montado de los bloques en la consola de parafina:

1. Dejar los bloques en la parafina líquida de la consola durante un mínimo de 30'.
2. Abrir los casetes y colocar el tejido en un molde lleno de parafina líquida.
3. Dejar solidificar la parafina a temperatura ambiente sobre una placa fría, formándose así un bloque sólido con el tejido en su interior.
4. Desbastar el bloque de parafina mediante cortes de 15 µm hasta que todo el tejido esté representado en la superficie de corte.

5. Enfriar los bloques durante aproximadamente 2 horas (4°C) para facilitar el corte posterior.
6. Realizar cortes de 4 µm.
7. Depositar las secciones en un baño termostático a aproximadamente 45°C, de modo que los cortes floten y se estiren, evitando la presencia de arrugas en los mismos.
8. Recoger las secciones con portaobjetos tratados con xilol (starfrost).
9. Secar los porta objetos a 56°C durante 30' o a 37°C durante 12 horas.

ANEXO 2 - Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina

- Desparafinado

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Xilol: 4'
2. Xilol: 4'
3. Alcohol 100°: 4'
4. Alcohol 100°: 4'
5. Alcohol 96°: 1'
6. Alcohol 70°: 1'
7. Agua corriente: 1'

- Tinción

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Hematoxilina: 5'
2. Agua corriente: 1'
3. Alcohol ácido: 2'
4. Eosina: 2'

- Deshidratación y montaje

1. Alcohol 100°: 1'
2. Alcohol 100°: 1'
3. Xilol: 1'
4. Xilol: 5'
5. Montar en Dibutylphtalate Poliestireno Xileno (DPX)

ANEXO 3 - Técnica de inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc} con los anticuerpos L42 y P4.

- Desparafinado

1. Xilol: 5' (x2)
2. Etanol 99°: 5' (x2)
3. Etanol 96°: 3'
4. Etanol 70°: 3''
5. Pasar las preparaciones a agua destilada.

- Desenmascarado de epítomos

1. Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%): 15'
2. Lavar 10' en agua corriente.
3. Pasar a agua destilada.
4. Digestión con proteinasa K: 4 g/ml, 15' a 37°C.
5. Tratamiento con calor: PTlink 20' a 96°C.

- Inmunodetección

1. Cubrir las muestras con solución de peroxidasa (kit Envision-DAB.DAKO, Dinamarca) durante 5' para bloquear la peroxidasa endógena.
2. Incubación con el anticuerpo primario anti-PrP (las IHQ han sido realizadas por duplicado con distintos anticuerpos):
L42 1/500 30'
P4 1/160 30'
3. Lavado en wash buffer 10x (tween 20 al 0.1% en agua destilada) 3x durante 5'.
4. Incubación con el anticuerpo secundario "goat anti-mouse" kit Envision DAB durante 30' a RT.
5. Lavado con wash buffer durante 5'(x3).
6. Incubación con el cromógeno DAB plus del kit Envision DAB de DAKO 10'.
7. Lavado con agua destilada durante 15' (x3).
8. Tinción con hematoxilina durante 30''.
9. Lavar con agua destilada.

- Deshidratación y montaje

1. Alcohol 70°: inmersión (x3)
2. Alcohol 96°: inmersión (x3)
3. Alcohol 100°: inmersión (x3)
4. Alcohol 100°: inmersión (x3)
5. Xilol: inmersión (x3)
6. Xilol: inmersión 5'
7. Montar en DPX

ANEXO 4 - Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre

Para realizar la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se utilizará el kit de QIAGEN® (QIAamp 96 Blood Kit), destinado a la extracción a partir de sangre.

- Lisis celular

1. Añadir 200 µl de la sangre a un eppendorf de 2 ml.
2. Añadir 200 µl de tampón AL y 50 µl de pK, y homogeneizar durante 15’’.
3. Incubar a 56°C durante 10 minutos en el termoblock.

Una vez se ha realizado la lisis celular, se añade 200 µl de etanol 100% y se mezcla durante 15’’.

- Recuperación del ADN precipitado en la columna y lavados

1. Transferir toda la muestra a una columna “DNeasy spin” que se encuentra en un tubo colector de 2 ml.
2. Centrifugar a 6.000g durante 1 minuto. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
3. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW1 y centrifugar a 6.000g durante 1 minuto. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
4. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW2 y centrifugar a 15.000g durante 3 minutos. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en un eppendorf esterilizado.

- Recuperación del ADN

1. Añadir 200 µl de buffer AE e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 6.000g durante 1 minuto.
3. Recoger el filtrado y volver a ponerlo en la columna. Centrifugar de nuevo a 6.000g durante 1 minuto.
4. Recuperar el filtrado y congelar.

ANEXO 5 -Protocolo de amplificación y secuenciación del marco de lectura abierto del gen *PRNP*

Para llevar a cabo la amplificación del marco de lectura abierto del gen *PRNP* se utilizará la técnica de la PCR basada en estudios anteriores (Acutis *et al.*, 2006), con una serie de modificaciones que se detallan a continuación.

- Preparación de la mezcla para la reacción de PCR

Se utilizarán los reactivos del kit de PCR de QIAGEN®. La cantidad de cada reactivo se multiplicará por el número de muestras a amplificar, añadiendo a este número dos más para los controles negativos.

Reactivo	Cantidad	Concentración
Tampón 10x	5 µl	10x
QSolution	10 µl	5x
Cebador FWD	2,5 µl	1/20
Cebador REV	2,5 µl	1/20
dNTPs (A,C,G,T)	1 µl	10 mM
Taq DNA polimerasa	0,6 µl	5 U.I./µl
H2O ultrapura 18M	26,4 µl	-

Los cebadores variarán según a qué especie animal pertenezcan las muestras a amplificar:

- Cabras:

1. PrP 8 (fwd): (5'-CAGGTTAACGATGGTGAAAAGCCACATAGG-3')
2. PrP 9 (rev): (5'-GGAATTCTATCCTACTATGAGAAAAATGAGG- 3')

A continuación se dispensan en cada pocillo de la placa del kit 2 µl de solución de ADN y 48 µl de mezcla, disponiéndose así de un volumen total de PCR de 50 µl. Se dispensará también la muestra en dos pocillos sin ADN que servirán como controles negativos.

- Reacción de PCR

Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1
94°C	60 segundos	40X
58°C	90 segundos	
72°C	60 segundos	
72°C	7 minutos	1
4°C	O.N.	1

- Electroforesis en gel de agarosa

Una vez se complete el programa de PCR, se llevará a cabo una electroforesis para comprobar que se ha amplificado el gen correctamente. En primer lugar se preparará el gel siguiendo los siguientes pasos:

1. Mezclar en un matraz de 1 g de agarosa y 50 ml de TBE 1x.
2. Calentar la mezcla hasta ebullición y añadir 5 µl de Gel Green® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®).
3. Verter en la cubeta de electroforesis, colocar el peine y dejar enfriar.

A continuación se cargará el gel y se realizará la electroforesis:

1. Cargar 8 µl de producto amplificado y 2 µl de azul de bromofenol.
2. Cargar 1 µl de marcador molecular de 1 Kb en el extremo del gel.
3. Realizar la electroforesis a 100V durante 10 minutos.

Una vez terminada la PCR, se comprobará la correcta amplificación del gen *PRNP* mediante la visualización del gel con un analizador de imagen con luz ultravioleta, utilizando el software Quantity One®.

- Purificación del ADN

1. Añadir los productos de PCR (42 µl) a los pocillos de una placa de filtros Millipore®.
2. Acoplar la placa de filtros a la bomba de vacío “vacuum minifold” de 24 pulgadas Hg de presión durante 3 minutos.
3. Añadir 40 µl de agua pura, tapar la placa y colocar en agitación durante 45 minutos.

Una vez el ADN amplificado esté purificado, se enviará a secuenciar junto con los cebadores correspondientes al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional, perteneciente al Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

ANEXO 6 - Protocolo de amplificación y secuenciación del marco de lectura abierto del gen *SPRN*.

Para llevar a cabo la amplificación del marco de lectura abierto del gen *SPRN* se utilizará la técnica de la PCR con los reactivos:

Reactivo	Cantidad	Concentración
Cebador FWD	0.2 µl	100µmolar
Cebador REV	0.2 µl	100µmolar
Master Mix AmpliTaq Gold® 360	25 µl	-
360 GC Enhancer	10 µl	-
H2O destilada esterilizada	12,6 µl	-

- Preparación de la mezcla para la reacción de PCR

La cantidad de cada reactivo se multiplicará por el número de muestras a amplificar, añadiendo a este número dos más para los controles negativos.

Los cebadores variarán según a qué especie animal pertenezcan las muestras a amplificar:

- Ciervos: fwd: 5` - AACTGGGCGGCCCGCCGTGTGC - 3`

rev: 5` - GGCTGGGTAGCCTCTAAGGTGGC - 3`

- Cabras: fwd: 5` - AACTGGGCGGCCCGCCGTGTGC - 3`

rev: 5` - CAGGAGGTGTACAGCTTCAGGG - 3`

A continuación se dispensan en cada pocillo de la placa del kit 2 µl de solución de ADN y 48 µl de mezcla, disponiéndose así de un volumen total de PCR de 50 µl. Se dispensará también la muestra en dos pocillos sin ADN que servirán como controles negativos.

- Reacción de PCR

Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 minutos	1
95°C	60 segundos	40X
58°C	30 segundos	
72°C	60 segundos	
72°C	10 minutos	1
4°C	O.N.	1

- Electroforesis en gel de agarosa

Una vez se complete el programa de PCR, se llevará a cabo una electroforesis para comprobar que se ha amplificado el gen correctamente. En primer lugar se preparará el gel siguiendo los siguientes pasos:

1. Mezclar en un matraz 2,25 g de agarosa y 150 ml de TBE 1x.
2. Calentar la mezcla hasta ebullición y añadir 15 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain.
3. Verter en la cubeta de electroforesis, colocar el peine y dejar enfriar.

A continuación se cargará el gel y se realizará la electroforesis:

1. Cargar 15 µl de producto amplificado y 2 µl de azul de bromofenol.
2. Cargar 1 µl de marcador molecular de 1 Kb en el extremo del gel.
3. Realizar la electroforesis a 150V durante 30 minutos.

Una vez terminada la PCR, se comprobará la correcta amplificación del gen *SPRN* mediante la visualización del gel con un analizador de imagen con luz ultravioleta.

- Purificación del ADN

1. Añadir a los productos de PCR 15 µl de carbón activado (0,8 g de carbón activado en 50 ml de agua destilada esterilizada).
2. Mezclar con vortex y dejar reposar por 10 minutos.
3. Centrifugar a 2.750 rpm durante 5 minutos para sedimentar el carbón

- Secuenciación

Una vez el ADN amplificado esté purificado, se realiza la reacción de secuenciación con los reactivos:

Reactivo	Cantidad	Concentración
Cebador SEQ.	1 µl	10pmol/ µl
Big Dye	2 µl	-
Buffer de secuenciación 5x	3 µl	-
H2O destilada esterilizada	12 µl	-

El cebador utilizado en la secuenciación para ciervos y cabras:

5` - CTCTGCTGCTAGCGGCCACC - 3`

El volumen total de la reacción de es de 20µl, 2 µl del producto de PCR y 18 µl de la mezcla. Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Estadio	Temperatura	Tiempo
Desnaturación	96 °C	25 seconds
Anillamiento	53°C	15 seconds (25 repeticiones)
Alargamiento	60°C	4 minutes
Enfriamiento	4 °C	∞

Para purificar la reacción de secuenciación:

1. Se añade 5 µl de 125mM EDTA + 60 µl de etanol 100%.
2. Mezclar en vortex la reacción e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Centrifugar a 2.750 rpm durante 30 minutos a 4°C.
4. Remover el sobrenadante y añadir 60 µl de etanol 70%.
5. Centrifugar a 2750rpm durante 15 minutos a 4°C.
6. Remover el sobrenadante y secar al aire durante 15 minutos.

Tras la purificación de la reacción de secuenciación añadir a cada pocillo 10 µl de HI-DI, pasar a una placa y colocar la placa en el analizador 3130.

ANEXO 7 - Protocolo de amplificación y secuenciación de la región promotora del gen *PRNP*

Reactivo	Cantidad	Concentración
Cebador FWD	0.2 µl	100µmolar
Cebador REV	0.2 µl	100µmolar
Master Mix AmpliTaq Gold® 360	25 µl	-
H2O destilada esterilizada	22,6 µl	-

Para llevar a cabo la amplificación de la región promotora del gen *PRNP* se utilizará la técnica de la PCR con los reactivos:

- Preparación de la mezcla para la reacción de PCR

La cantidad de cada reactivo se multiplicará por el número de muestras a amplificar, añadiendo a este número dos más para los controles negativos.

Los cebadores variarán según a qué especie animal pertenezcan las muestras a amplificar:

- Ciervos:

fwd: 5`- GAACTGAGTAAATGACGGCAGGTGA - 3`

rev: 5`- CCAATTCGCGTCTCCTCTGGGCAT - 3`

A continuación se dispensan en cada pocillo de la placa del kit 2 µl de solución de ADN y 48 µl de mezcla, disponiéndose así de un volumen total de PCR de 50 µl. Se dispensará también la muestra en dos pocillos sin ADN que servirán como controles negativos.

- Reacción de PCR

Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 minutos	1
95°C	30 segundos	40X
58°C	30 segundos	
72°C	60 segundos	
72°C	10 minutos	1
4°C	O.N.	1

- Electroforesis en gel de agarosa

Una vez se complete el programa de PCR, se llevará a cabo una electroforesis para comprobar que se ha amplificado el gen correctamente. En primer lugar se preparará el gel siguiendo los siguientes pasos:

1. Mezclar en un matraz de 2.25 g de agarosa y 150 ml de TBE 1x.
2. Calentar la mezcla hasta ebullición y añadir 15 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain.
3. Verter en la cubeta de electroforesis, colocar el peine y dejar enfriar.

A continuación se cargará el gel y se realizará la electroforesis:

1. Cargar 15 µl de producto amplificado y 1 µl de azul de bromofenol.
2. Cargar 1 µl de marcador molecular de 1 Kb en el extremo del gel.
3. Realizar la electroforesis a 150V durante 30 minutos.

Una vez terminada la PCR, se comprobará la correcta amplificación del gen *PRNP* mediante la visualización del gel con un analizador de imagen con luz ultravioleta.

- Purificación del ADN

1. Añadir a los productos de PCR 15 µl de carbón activado (0,8 g de carbón activado en 50 ml de agua destilada esterilizada).
2. Mezclar con vortex y dejar reposar por 10 minutos.
3. Centrifugar a 2.750 rpm durante 5 minutos para sedimentar el carbón

- Secuenciación

Una vez el ADN amplificado esté purificado, se realiza la reacción de secuenciación con los reactivos:

Reactivo	Cantidad	Concentración
Cebador SEQ.	1 µl	10pmol/ µl
Big Dye	2 µl	-
Buffer de secuenciación 5x	3 µl	-
H2O destilada esterilizada	12 µl	-

El cebador utilizado en la secuenciación para ciervo:

5` - GCTAATATCCTTTCTAGGCCTC - 3`

El volumen total de la reacción de es de 20µl, 2 µl del producto de PCR y 18 µl de la mezcla. Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Estadio	Temperatura	Tiempo
Desnaturación	96 °C	10 seconds
Anillamiento	53°C	15 seconds (25 repeticiones)
Alargamiento	60°C	4 minutes
Enfriamiento	4 °C	∞

Para purificar la reacción de secuenciación:

1. Se añade 5 μ l de 125mM EDTA + 60 μ l de etanol 100%.
2. Mezclar en vortex la reacción e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Centrifugar a 2.750 rpm durante 30 minutos a 4°C.
4. Remover el sobrenadante y añadir 60 μ l de etanol 70%.
5. Centrifugar a 2.750 rpm durante 15 minutos a 4°C.
6. Remover el sobrenadante y secar al aire durante 15 minutos.
7. Añadir 10 μ l de HI-DI y colocar la placa en el analizador 3130.

ANEXO 8 - Protocolo de Western Blot VLA Prionics check BSE

- Tallado y digestión

1. Añadir 0.5 g de tejido a 5 ml de tampón de homogeneización (1x).
2. Homogeneizar la muestra en el FASTH (homogeneizador automático) y dejar reposar la espuma.
3. Centrifugar 1,5 ml de homogeneizado a 1.127 g o 5.000 rpm 5' a 10°C.
4. 10 µl de pK + 100 µl de sobrenadante + 10 µl de tampón digestión.
5. Incubar a 50°C durante 45'.
6. Añadir 10 µl de solución Stop.

- Electroforesis

1. Preparar y cargar 2 geles.
2. Calentar las muestras a 105°C, el control del kit 2' a 65°C, y el control biotinilado 2' a 100°C.
3. Cargar las muestras y los controles en los dos geles.
4. Realizar la electroforesis a 200V durante 45'.

- Transferencia

1. Equilibrar membranas: Metanol 10'' + agua destilada 5' + tampón de transferencia 10'.
2. Realizar la transferencia a 150V durante 60'.

- Inmunodetección

1. Añadir tampón de bloqueo 30' a temperatura ambiente.
2. Añadir anticuerpo primario: 6H4 (1/5000) en TBS+Tween (TBST), incubar 12 h a 4°C en agitación lenta.
3. Añadir anticuerpo primario: P4 (1/5000) en TBST, incubar 12 h a 4°C en agitación lenta.
4. Realizar 3 lavados de 7' con TBST.
5. Añadir anticuerpo secundario: (1/5000) en TBST + streptavidina (1/2000).
6. Realizar 3 lavados de 7' con TBST.
7. Mantener las membranas durante 5' en Luminiscencia.
8. Revelar con CDPstar.

ANEXO 9- Protocolo de ELISA IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit

- Tallado

1. Tallar entre 0,30 – 0,35 g de tejido.
2. Trituración de la muestra mediante el uso de tubos de trituración y homogenizador. Se ejecutan dos fases de agitación iguales de 45 segundos a 6.500 rpm con un tiempo de espera de 60 segundos por ciclo. Se realizan 3-4 ciclos para todas las muestras.

- Bloqueo de PrP^C

1. Preparar diluyente (mezcla de D1 y D2 en proporción de 40 µl de D2 en 1 ml de D1).
2. Añadir 30 µl de diluyente en cada pocillo de la placa de dilución.
3. Transferir 120 µl del contenido de los tubos de trituración al pocillo correspondiente de la placa.

- Detección de PrP^{Sc}

1. Distribuir 100 µl de muestra diluida a la placa de captura de antígeno, previa homogenización.
2. Distribuir 100 µl de cada uno de los controles. El control positivo y el control negativo se colocan por duplicado.
3. Cubrir la placa con un film adhesivo transparente e incubar en agitación lenta (200rpm) y a temperatura ambiente durante 60 minutos.
4. Lavar la placa mediante seis ciclos seguidos de llenado y vaciado de los pocillos con solución de lavado 1.
5. Secar por inversión.
6. Añadir 100 µl de tampón de acondicionamiento.
7. Incubar con la placa tapada: 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Lavar la placa mediante tres ciclos seguidos de llenado y vaciado de los pocillos con solución de lavado 2.
9. Secar por inversión.
10. Añadir 100 µl de conjugado de anticuerpo anti-PrP.
11. Sellar la placa con film adhesivo transparente.
12. Incubar la placa durante 2 horas en reposo.
13. Añadir 100 µl de la solución de sustrato TMB y cubrir la placa con un film adhesivo de plata para mantenerla protegida de la luz.

14. Incubar en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Añadir 10 µl de solución de parada a cada pocillo.
16. Lectura de la densidad óptica de las muestras en un fotómetro bicromático.

- Cálculo de resultados

1. Para que el ensayo sea válido, la medida del control negativo (NCM) debe tener un valor de $A_{450} - A_{REF}$ menor que 0,150 y la medida del control positivo (PCM) debe tener un valor de $A_{450} - A_{REF}$ mayor o igual que 0,400.

Cálculo de la media del control negativo:

$$NCM = A_1 (A_{450} - A_{REF}) + B_1 (A_{450} - A_{REF}) / 2$$

Cálculo de la media del control positivo:

$$PCM = C_1 (A_{450} - A_{REF}) + D_1 (A_{450} - A_{REF}) / 2.$$

2. Punto de corte para pequeños rumiantes = $NCM + 0.120$. La muestra es negativa si $< NCM + 0.120$, mientras que será positiva si $\geq NCM + 0.120$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acin C, Martin-Burriel I, Monleon E, Lyahyai J, Pitarch JL, Serrano C, Monzon M, Zaragoza P, Badiola JJ. (2013). Prion protein gene variability in Spanish goats. Inference through susceptibility to classical scrapie strains and pathogenic distribution of peripheral PrP(sc). *PLoS One*, 8, e61118.
- Acutis PL, Bossers A, Priem J, Riina MV, Peletto S, Mazza M, Casalone C, Forloni G, Ru G, Caramelli M. (2006). Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. *J Gen Virol*, 87, 1029-1033.
- Acutis PL, Colussi S, Santagada G, Laurenza C, Maniaci MG, Riina MV, Peletto S, Goldmann W, Bossers A, Caramelli M, Cristoferi I, Maione S, Sacchi P, Rasero R. (2008). Genetic variability of the PRNP gene in goat breeds from Northern and Southern Italy. *J Appl Microbiol*, 104, 1782-1789.
- Acutis PL, Martucci F, D'Angelo A, Peletto S, Colussi S, Maurella C, Porcario C, Iulini, Mazza M, Dell'atti L, Zuccon F, Corona C, Martinelli N, Casalone C, Caramelli M, Lombardi G. (2012). Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene. *Vet Res*, 43, 8.
- Agrimi U, Conte M, Morelli L, Di Bari MA, Di Guardo G, Ligios C, Antonucci G, Aufiero GM, Pozzato N, Mutinelli F, Nonno R, Vaccari G. (2003). Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Vet Res Commun*, 27, 31-38.
- Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Alamillo E, Miranda A, Prieto I, Bossers A, Andreoletti O, Torres JM. (2014). Role of the goat K222-PrP(C) polymorphic variant in prion infection resistance. *J Virol*, 88, 2670-2676.
- Aguilar-Calvo P, Fast C, Tauscher K, Espinosa JC, Groschup MH, Nadeem M, Goldmann W, Langeveld J, Bossers A, Andreoletti O, Torres JM. (2015). Effect of Q211 and K222 PRNP polymorphic variants in the susceptibility of goats to oral infection with goat bovine spongiform encephalopathy. *J Infect Dis*, 212, 664-672.
- Aguzzi A, Calella AM. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*, 89, 1105-1152.
- Aguzzi A, Heikenwalder M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, 4, 765-775.
- Aguzzi A, Polymenidou M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 116, 313-327
- Aguzzi A, Sigurdson CJ. (2004). Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol*, 4, 725-736.
- Aichele P, Zinke J, Grode L, Schwendener RA, Kaufmann SH, Seiler P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne

particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 171, 1148–1155.

Aleksandersen M, Nicander L, Landsverk T. (1991). Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid follicles in the large intestine of sheep. *Dev Comp Immunol*, 15,

Allais-Bonnet A, Pailhox E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Front Cell Dev Biol*, 2, 56.

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214, 764-766.

Alper T, Haig DA, Clarke MC. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 22, 278-284.

Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol*, 81, 3115-3126.

Andreoletti O, Orge L, Benestad SL, Beringue V, Litaise C, Simon S, Le Dur A, Laude H, Simmons H, Lugan S, Corbiere F, Costes P, Morel N, Schelcher F, Lacroux C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, 7, e1001285.

Andreoletti O, Morel N, Lacroux C, Rouillon V, Barc C, Tabouret G, Sarradin P, Berthon P, Bernardet P, Mathey J, Lugan S, Costes P, Corbiere F, Espinosa JC, Torres JM, Grassi J, Schelcher F, Lantier F. (2006). Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J. Gen. Virol*, 87, 1043-1046.

Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbiere F, Ferre P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F. (2004). PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, 10, 591-593.

Babar ME, Abdullah M, Nadeem A, Haq AU. (2009). Prion protein gene polymorphisms in four goat breeds of Pakistan. *Mol Biol Rep*, 36, 141-144.

Baeten LA, Powers BE, Jewell JE, Spraker TR, Miller MW. (2007). A natural case of chronic wasting disease in a free-ranging moose (*Alces alces shirasi*). *J Wildl Dis*, 43, 309-314.

Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, Hivroz C, Carnaud C. (2006). Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol*, 176, 7254-7262.

Banks WA, Niehoff ML, Adessi C, Soto C. (2004). Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 125–30.

Baylis M, Houston F, Kao RR, McLean AR, Hunter N, Gravenora MB. (2002). BSE - a wolf in sheep's clothing? *Trends Microbiol*, 10, 563–570.

Barillet F, Mariat D, Amigues Y, Faugeras R, Caillat H, Moazami-Goudarzi K, Rupp R, Babilliot JM, Lacroux C, Lugan S, Schelcher F, Chartier C, Corbiere F, Andreoletti O, Perrin-Chauvineau C. (2009). Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie. *J Gen Virol*, 90, 769-776.

Bartz JC, McKenzie DI, Bessen RA, Marsh RF, Aiken JM. (1994). Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *J Gen Virol*, 75, 2947-2953.

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46, 417-428.

Beekes M, McBride PA. (2007). The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J*, 274, 588–605.

Beck JA, Campbell TA, Adamson G, Poulter M, Uphill JB, Molou E, Collinge J, Mead, S. (2008). Association of a null allele of SPRN with variant Creutzfeldt–Jakob Disease. *J Med Genet*, 45, 813–817.

Begara-McGorum I, Gonzalez L, Simmons M, Hunter N, Houston F, Jeffrey M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol*, 127, 59-68.

Begara-McGorum I, Clark AM, Martin S, Jeffrey M. (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec*, 147, 439-441.

Bellworthy SJ, Dexter G, Stack M, Chaplin M, Hawkins SA, Simmons MM, Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Hill P. (2005). Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet Rec*, 157, 206.

Bellworthy SJ, Dexter G, Stack M, Chaplin M, Hawkins SA, Simmons MM, Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Hill P. (2008). Oral transmission of BSE to VRQ/VRQ sheep in an experimental flock. *Vet Rec*, 162, 130–131.

Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 76, 509-517.

Benestad SL, Mitchell G, Simmons M, Ytrehus B, Vikoren T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, 47, 88.

Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, 153, 202-208.

Beringue V, Herzog L, Jaumain E, Reine F, Sibille P, Le Dur A, Vilotte JL, Laude H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science*, 335, 472-475.

Bessen RA, Marsh RF. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 66, 2096-2101.

Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, 5, 110-115.

Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulos O, Sklaviadis T. (2002). Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol*, 83, 713-721.

Bishop MT, Diack AB, Ritchie DL, Ironside JW, Will RG, Manson JC. (2013). Prion infectivity in the spleen of a PRNP heterozygous individual with subclinical variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 136, 1139-1145.

Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 77, 2669-2673.

Bossers A, Belt P, Raymond GJ, Caughey B, de Vries R, Smits MA. (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 4931-4936.

Bouzas IG, Dovas CI, Banos G, Papanastasopoulou M, Kritas S, Oevermann A, Papakostaki D, Evangelia C, Papadopoulos O, Seuberlich T, Koptopoulos G. (2010). Caprine PRNP polymorphisms at codons 171, 211, 222 and 240 in a Greek herd and their association with classical scrapie. *J Gen Virol*, 91, 1629-1634.

Bradley R. (2002). Bovine spongiform encephalopathy. Update. *Acta Neurobiol Exp*, 2, 183-195.

Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. (2001). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerg Infect Dis*, 7, 6-16.

Brown KL, Gossner A, Mok S, Mabbott N. (2012). The effects of host age on the transport of complement-bound complexes to the spleen and the pathogenesis of intravenous scrapie infection. *J Gen Virol*, 86, 25-35.

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 498-501.

Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 343, 405-411.

- Bruce ME, Fraser H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172, 125-138.
- Brunelle BW, Hamir AN, Baron T, Biacabe AG, Richt JA, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller J.M., Nicholson, EM. (2007). Polymorphisms of the prion gene promoter region that influence classical bovine spongiform encephalopathy susceptibility are not applicable to other transmissible spongiform encephalopathies in cattle. *J. Anim. Sci*, 85, 3142–3147.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-1347.
- Capellari S, Strammiello R, Saverioni D, Kretzschmar H, Parchi P. (2011). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*, 121, 21–37.
- Caramelli M, Ru G, Casalone C, Bozzetta E, Acutis PL, Calella A, Forloni G. (2001) Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Rec*, 148, 531–536.
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 3065-3070.
- Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121, 195-206.
- Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, 63, 175-181.
- Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE. (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol*, 65, 6597-6603.
- Chelle PL. (1942). A case of trembling in the goat. *Academy of Veterinary Medicine of France Bulletin*, 15, 294–295.
- Collinge J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-550.
- Collinge J, Clarke AR. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318, 930-936.
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337, 1441-1442.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383, 685-690.

Colussi S, Vaccari G, Maurella C, Bona C, Lorenzetti R, Troiano P, Casalnuovo F, Di Sarno A, Maniaci MG, Zuccon F, Nonno R, Casalone C, Mazza M, Ru G, Caramelli M, Agrimi U, Acutis PL. (2008). Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats. *J Gen Virol*, 89, 3173-3176.

Come JH, Fraser PE, Lansbury PT. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 5959-5963.

Cotto E, Andre M, Forgue J, Fleury HJ, Babin PJ. (2005). Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS J*, 272, 500-513.

Corbiere F, Perrin-Chauvineau C, Lacroux C, Costes P, Thomas M, Bremaud I, Martin S, Lukan S, Chartier C, Schelcher F, Barillet F, Andreoletti O. (2013). PrP-associated resistance to scrapie in five highly infected goat herds. *J Gen Virol*, 94, 241-245.

Cuillé J, Chelle P. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est elle inoculable? *C R Acad Sci*, 203, 1552- 1554.

Creutzfeldt G. (1920). Über eine eigenartigen hertförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Neurol Psychiatr*, 57, 1-19.

Curnow RN, Hau CM. (1996). The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Vet Rec*, 138, 407-408.

D'Angelo A, Maurella C, Bona C, Borrelli A, Caramelli M, Careddu ME, Jaggy A, Ru G. (2007). Assessment of clinical criteria to diagnose scrapie in Italy. *Vet J*, 174, 106-112.

Dassanayake RP, White SN, Madsen-Bouterse SA, Schneider DA, O'Rourke KI. (2015). Role of the PRNP S127 allele in experimental infection of goats with classical caprine scrapie. *Anim Genet*, 46, 341.

Dassanayake RP, Madsen-Bouterse SA, Truscott TC, Zhuang D, Mousel MR, Davis WC, Schneider DA. (2016). Classical scrapie prions are associated with peripheral blood monocytes and T-lymphocytes from naturally infected sheep. *BMC Vet Res*, 12, 27.

Dassanayake RP, White SN, Madsen-Bouterse SA, Schneider DA, O'Rourke KI. (2015). Role of the PRNP S127 allele in experimental infection of goats with classical caprine scrapie. *Anim Genet*, 46, 341.

Denkers ND, Hayes-Klug J, Anderson KR, Seelig DM, Haley NJ, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mathiason CK, Hoover EA. (2013). Aerosol transmission of chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Virol*, 87, 1890-1892.

Detwiler LA, Baylis M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, 22, 121-43.

Diaz-San Segundo F, Salguero FJ, de Avila A, Espinosa JC, Torres JM, Brun A. (2006). Distribution of the cellular prion protein (PrPC) in brains of livestock and domesticated species. *Acta Neuropathol*, 112, 587-595.

- Dickinson AG, Outram GW. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, 135, 63-83.
- Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC, Rennie JC. (1968). Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. *J Comp Pathol*, 78, 313-321.
- Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J. (1991). CJD discrepancy. *Nature*, 353, 801-802.
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. (1989). Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 974-979.
- Dormont, D. (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett*, 529, 17-21.
- Ducrot C, Arnold M, de Koeijer A, Heim D, Calavas D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet Res*, 39, 15.
- Dustan BH, Spencer YI, Casalone C, Brownlie J, Simmons MM. (2008). Histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases. *Vet Pathol*, 45, 443-454.
- EFSA. (2005). Opinion on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in Small Ruminants. *The EFSA Journal*, 276, 1-30.
- Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 156, 523-524.
- Ersdal C, Ulvund MJ, Espenes A, Benestad SL, Sarradin P, Landsverk T. (2005). Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol*, 42, 258-274.
- Everest SJ, Ramsay AM, Chaplin MJ, Everitt S, Stack MJ, Neale MH, Jeffrey M, Moore SJ, Bellworthy SJ, Terry LA. (2011). Detection and localisation of PrP(Sc) in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One*, 6, e19737.
- Falsig J, Nilsson KP, Knowles TP, Aguzzi A. (2008). Chemical and biophysical insights into the propagation of prion strains. *HFSP J*, 2, 332-341.
- Fast C, Goldmann W, Berthon P, Tauscher K, Andréoletti O, Lantier I, Rossignol C, Bossers A, Jacobs JG, Hunter N, Groschup MH, Lantier F, Langeveld JPM. (2017). Protecting effect of PrP codons M142 and K222 in goats orally challenged with bovine spongiform encephalopathy prions. *Vet Res*, 48, 52.

- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*, 113, 177-192.
- Foster JD, Dickinson AG. (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec*, 123, 5-8.
- Foster JD, Hope J, Fraser H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, 133, 339–341.
- Foster JD, Goldmann W, Hunter N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*, 8, e79433.
- Fraser H, Dickinson AG. (1968). The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, 78, 301–311.
- Frigg R, Wenzel A, Samardzija M, Oesch B, Wariwoda H, Navarini AA, Seeliger MW, Tanimoto N, Reme C, Grimm C. (2006). The prion protein is neuroprotective against retinal degeneration in vivo. *Exp Eye Res*, 83, 1350-1358.
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 9097-9101.
- Gajdusek DC, Zigas V. (1957). Degenerative diseases of the central nervous system in New Guinea: the endemic occurrence of “kuru” in the native population. *New Engl J Med*, 257, 212–214.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 209, 794–796.
- Gajdusek DC, Gibbs Jr CJ, Alpers M. (1967). Transmission and passage of experimental “kuru” to chimpanzees. *Science*, 155, 212–214.
- Garza MC, Fernandez-Borges N, Bolea R, Badiola JJ, Castilla J, Monleon E. (2011). Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One*, 6, e27525.
- Garza MC, Monzon M, Marin B, Badiola JJ, Monleon E. (2014). Distribution of peripheral PrP(Sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, 9, e97768.
- Gavier-Widen D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*, 17, 509-527.
- Genoud N, Behrens A, Arrighi I, Aguzzi A. (2003). Prion proteins and infertility: insight from mouse models. *Cytogenet Genome Res*, 103, 285-289.
- Georgsson G, Sigurdarson S, Brown P. (2006). Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol*, 87, 3737-3740.

Glaysher BR, Mabbott NA. (2007). Role of the draining lymph node in scrapie agent transmission from the skin. *Immunol Lett*, 109, 64-71.

Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P, Asher DM, Brown WT, Lin S, Teener JW, Feinstone SM, Rubenstein R, Kascsak RJ. (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, 106, 204-206.

Goldmann W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res*, 39, 30.

Goldmann W, Chong A, Foster J, Hope J, Hunter N. (1998). The shortest known prion protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic. *J Gen Virol*, 79, 3173-3176.

Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, Dawson M, Hunter N. (1996). Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol*, 77, 2885-2891,

Goldmann W, Ryan K, Stewart P, Parnham D, Xicohtencatl R, Fernandez N, Saunders G, Windl O, Gonzalez L, Bossers A, Foster J. (2011). Caprine prion gene polymorphisms are associated with decreased incidence of classical scrapie in goat herds in the United Kingdom. *Vet Res*, 42, 110.

Gonzalez L, Martin S, Begara-McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, Jeffrey M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, 126, 17-29.

Gonzalez L, Dagleish MP, Bellworthy SJ, Siso S, Stack MJ, Chaplin MJ, Davis LA, Hawkins SA, Hughes J, Jeffrey M. (2006). Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet Rec*, 158, 325-331.

Gonzalez L, Jeffrey M, Siso S, Martin S, Bellworthy SJ, Stack MJ, Chaplin MJ, Davis L, Dagleish MP, Reid HW. (2005a). Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec*, 156, 846-847.

Gonzalez L, Martin S, Houston FE, Hunter N, Reid HW, Bellworthy SJ and Jeffrey M. (2005b). Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol*, 86, 827- 838.

Gonzalez L, Martin S, Hawkins SA, Goldmann W, Jeffrey M, Siso S. (2010). Pathogenesis of natural goat scrapie: modulation by host PRNP genotype and effect of co-existent conditions. *Vet Res*, 41, 48.

Gonzalez L, Pitarch JL, Martin S, Thurston L, Moore J, Acin C, Jeffrey M. (2014). Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of scrapie in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the oral and conjunctival routes. *J Comp Pathol*, 150, 47-56.

Gonzalez L, Martin S, Siso S, Konold T, Ortiz-Pelaez A, Phelan L, Goldmann W, Stewart P, Saunders G, Windl O, Jeffrey M, Hawkins SA, Dawson M, Hope J. (2009). High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of PRNP genotype and age. *Vet Res*, 40, 65.

Gossner AG, Bennet N, Hunter N, Hopkins J. (2009). Differential expression of Prnp and Sprn in scrapie infected sheep also reveals Prnp genotype specific differences. *Biochem Biophys Res Commun*, 378, 862-866.

Green KM, Browning SR, Seward TS, Jewell JE, Ross DL, Green MA, Williams ES, Hoover EA, Telling GC. (2008). The elk PRNP codon 132 polymorphism controls cervid and scrapie prion propagation. *J Gen Virol*, 89, 598-608.

Griffith JS. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-1044.

Gruffydd-Jones TJ, Galloway PE, Pearson GR. (1991). Feline spongiform encephalopathy. *JSAP*, 33, 471-476.

Gurgul A, Polak MP, Larska M, Słota E. (2012). Association of an indel polymorphism in the 3'UTR of the caprine SPRN gene with scrapie positivity in the central nervous system. *J Gen Virol*, 93, 1620-1623.

Haase B, Doherr MG, Seuberlich T, Drogemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebel K, Ziegler U, Groschup MH, Zurbriggen A, Leeb T. (2007). PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet*, 8, 15.

Hadlow WJ. (1959). Scrapie and Kuru. *The Lancet*, 2, 289-290.

Hadlow WJ, Race RE, Kennedy RC. (1987). Temporal distribution of transmissible mink encephalopathy virus in mink inoculated subcutaneously. *J Virol*, 61, 3235-3240.

Haley NJ, Mathiason CK, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA. (2009b). Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PLoS One*, 4, e7990.

Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA. (2009b). Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS One*, 4, e4848.

Hamir AN, Gidlewski T, Spraker TR, Miller JM, Creekmore L, Crocheck M, Cline T, O'Rourke KI. (2006). Preliminary observations of genetic susceptibility of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) to chronic wasting disease by experimental oral inoculation. *J Vet Diagn Invest*, 18, 110-114.

Haybaeck J, Heikenwalder M, Klevenz B, Schwarz P, Margalith I, Bridel C, Mertz K, Zirdum E, Petsch B, Fuchs TJ, Stitz L, Aguzzi A. (2011). Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS Pathog*, 7, e1001257.

Harmeyer S, Pfaff E, Groschup MH. (1998). Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol*, 79, 937-945.

Hartsough GR, Burger D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J. infect. Dis*, 115, 387-392.

Healy AM, Weavers E, McElroy M, Gomez-Parada M, Collins JD, O'Doherty E, Sweeney T, Doherty ML. (2003). The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*, 17, 908-916.

Heaton MP, Leymaster KA, Freking BA, Hawk DA, Smith TP, Keele JW, Snelling WM, Fox JM, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. (2003). Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome*, 14, 765-777.

Hill AF, Sidle KC, Joiner S, Keyes P, Martin TC, Dawson M, Collinge J. (1998). Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci Lett*, 255, 159-162.

Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*, 349, 99-100.

Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 352, 703-704.

Hope J, Wood SC, Birkett CR, Chong A, Bruce ME, Cairns D, Goldmann W, Hunter N, Bostock CJ. (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol*, 80, 1-4.

Hortells P, Monzón M, Monleón E, Acín C, Vargas A, Bolea R, Luján L, Badiola JJ. (2006). Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural scrapie in sheep. *Brain Res*, 1108, 188-194.

Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, 356, 999-1000.

Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez L, Foster J, Parnham D, Hunter N. (2003). Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 423, 498.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, 338, 342-345.

Hu W, Rosenberg RN, Stuve O. (2007). Prion proteins: a biological role beyond prion diseases. *Acta Neurol Scand*, 116, 75-82.

Hu S, Huai Y, Pan C, Lei C, Chen H, Lan X. (2013). Correlation between the insertion/deletion mutations of prion protein gene and BSE susceptibility and milk performance in dairy cows. *Infection International*, 2, 153-162.

Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, 141, 809-824.

Hunter N, Goldmann W, Foster JD, Cairns D, Smith G. (1997). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet Rec*, 141, 137-140.

Hunter N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, 5, 331-334.

Hunter N, Houston F, Foster J, Goldmann W, Drummond D, Parnham D, Kennedy I, Green A, Stewart P, Chonga A. (2012). Susceptibility of young sheep to oral infection with bovine spongiform encephalopathy decreases significantly after weaning. *J Gen Virol*, 86, 11856–11862.

Hussain A, Babar ME, Imran M, Haq IU, Javed MM. (2011). Detection of four novel polymorphisms in PrP gene of Pakistani sheep (Damani and Hashtnagri) and goats (Kamori and Local Hairy) breeds. *Virol J*, 8, 246.

Imran M, Mahmood S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virol J*, 8, 559.

Inoue S, Tanaka M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M. (1997). Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci*, 59, 175-183.

Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, Gavier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, Groschup M, Erkena JH, Davidse A, van Zijderveld FG, Baron T. (2007). Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol*, 45, 1821-1829.

Jakob A. (1921a). Über eigenartigen Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudesklerose-encephalopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Z Bervenheilkunde*, 70, 132–46.

Jakob A. (1921b). Über eigenartigen Erkrankung des Zentralnervensystem mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudesklerose-encephalopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Neurol Psychiatr*, 64, 147–228.

Jeffrey M y Wells GAH. (1988). Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angusi*). *Vet Pathol*, 25, 398-399.

Jeffrey M, Gonzalez L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33, 373-394.

Jeffrey M, Gonzalez L, Espenes A, Press CM, Martin S, Chaplin M, Davis L, Landsverk T, MacAldowie C, Eaton S, McGovern G. (2006a). Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J Pathol*, 209, 4-14.

Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Foster J, Langeveld JP, van Zijderveld FG, Grassi J, Hunter N. (2006b). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, 134, 171-181.

Jeffrey M, Gonzalez L, Chong A, Foster J, Goldmann W, Hunter N and Martin S. (2006c). Ovine infection with the agents of scrapie (CH1641 isolate) and bovine spongiform encephalopathy: immunochemical similarities can be resolved by immunohistochemistry. *J Comp Pathol*, 134, 17-29.

Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L. (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 84, 1033-1045.

Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Jackman R. (2001a). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol*, 125, 271-284.

Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I, Gonzalez L. (2001b). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, 125, 48-57.

Jeong BH, Kim YS. (2014). Genetic studies in human prion diseases. *J Korean Med Sci*, 29, 623-632.

Jeong HJ, Lee JB, Park SY, Song CS, Kim BS, Rho JR, Yoo MH, Jeong BH, Kim YS, Choi IS. (2007). Identification of single-nucleotide polymorphisms of the prion protein gene in sika deer (*Cervus nippon laiouanus*). *J Vet Sci*, 8, 299-301.

Jewell JE, Conner MM, Wolfe LL, Miller MW, Williams ES. (2005). Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 86, 2127-2134.

Johnson C, Johnson J, Clayton M, McKenzie D, Aiken J. (2003). Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis*, 39, 576-581.

Johnson C, Johnson J, Vanderloo JP, Keane D, Aiken JM, McKenzie D. (2006). Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 87, 2109-2114.

Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA. (2006). Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog*, 2, e32.

Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries R. (2006). A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol*, 4, 33.

Junt T, Scandella E, Ludewig B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol*, 8, 764-775.

- Kimberlin RH, Walker CA. (1989). Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res*, 12, 213-220.
- Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA. (1983). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol*, 64, 713–716.
- Kincaid AE, Hudson KF, Richey MW, Bartz JC. (2012). Rapid transepithelial transport of prions following inhalation. *J Virol*, 86, 12731-12740.
- Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 65, 6292-6295.
- Konold T, Bone G, Ryder S, Hawkins SA, Courtin F, Berthelin-Baker C. (2004). Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *Vet Rec*, 155, 659-666.
- Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res*, 4, 14.
- Konold T, Bone GE, Phelan LJ, Simmons MM, González L, Sisó S, Goldmann W, Cawthraw S, Hawkins SAC. (2010). Monitoring of clinical signs in goats with transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res*, 6,13.
- Kovacs GG, Budka H. (2008). Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*, 172, 555-565.
- Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. (2005). Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *J Vet Med Sci*, 67, 321-323.
- Yaman Y, Karadağ O, Ün C. (2017). Investigation of the prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Anatolian, Murrah, and crossbred water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod*, 49, 427–430.
- Lacroux C, Perrin-Chauvineau C, Corbiere F, Aron N, Aguilar-Calvo P, Torres JM, Costes P, Bremaud I, Lukan S, Schelcher F, Barillet F, Andreoletti O. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *J Virol*, 88, 2406-2413.
- Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lukan S, Corbiere F, Cassard H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-Tarisse C, Morel N, Schelcher F, Grassi J, Andreoletti O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, 4, e1000238.
- Lampo E, Duchateau L, Schepens B, Van Poucke M, Saelens X, Erkens T, Van Zeveren A, Peelman LJ. (2010). Identification of polymorphisms in the ovine Shadow of prion protein (SPRN) gene and assessment of their effect on promoter activity and susceptibility for classical scrapie. *Anim Genet*, 41, 169-178.

- Lampo E, Van Poucke M, Vandesompele J, Erkens T, Van Zeveren A, Peelman LJ. (2009). Positive correlation between relative mRNA expression of PRNP and SPRN in cerebral and cerebellar cortex of sheep. *Mol Cell Probes*, 23, 60-64.
- Lee YH, Sohn HJ, Kim MJ, Kim HJ, Lee WY, Yun EI, Tark DS, Cho IS, Balachandran A. (2013). Strain characterization of the Korean CWD cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci*, 75, 95-98.
- Ligos C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM. (2002) Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*, 127, 45–57.
- Ligos C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrale C, Cancedda MG, Madau L, Aguzzi A. (2005). PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*, 11, 1137-1138.
- Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. (2008). Physiology of the Prion Protein. *Physiol Rev*, 88, 673-728.
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363, 417-421.
- Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, 315, 997-1003.
- Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME. (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, 6, 719-720.
- Mabbott NA, McGovern G, Jeffrey M, Bruce ME. (2002). Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol*, 76, 5131-5139.
- Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME. (2003). Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol*, 77, 6845-6854.
- Maestrale C, Cancedda MG, Pintus D, Masia M, Nonno R, Ru G, Carta A, Demontis F, Santucci C, Ligos C. (2015). Genetic and pathological follow-up study of goats experimentally and naturally exposed to a sheep scrapie isolate. *J Virol*, 89, 10044-10052.
- Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*, 268, 105-114.
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, 115, 117-122.
- Manson JC, Tuzi NL. (2001). Transgenic models of the transmissible spongiform encephalopathies. *Expert Rev Mol Med*, 3, 1–15.

Martin S, Gonzalez L, Chong A, Houston FE, Hunter N, Jeffrey M. (2005). Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 86, 839-848.

Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science*, 314, 133-136.

Mc Gowan JP. (1922). Scrapie in sheep. *Scottish J. Agric*, 5, 367-75.

McKnight S, Tjian R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, 46, 795-805.

Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, Tinuper P, Avoni P, Mochi M, Baruzzi A, Hauw JJ, Ott J, Lugaresi E, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 326, 444-449.

Meng LP, Zhao DM, Liu HX, Yang JM, Ning ZY, Wu CD, Han CX. (2005). Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Chinese domestic sika deer (*Cervus nippon hortulorum*). *Anim Genet*, 36, 266-267.

Millhauser G.L. (2013). The rich chemistry of the copper and zinc sites in cellular prion protein. In: Zou W.Q., Gambetti P., editors. Prions and Diseases. Volume 1. Physiology and Pathophysiology; Springer Science + Business Media; New York, NY, USA: 2013. pp. 21–34.

Mohan J, Brown KL, Farquhar CF, Bruce ME, Mabbott NA. (2004). Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J Dermatol Sci*, 35, 101-111.

Mohan J, Bruce ME, Mabbott NA. (2005). Neuroinvasion by scrapie following inoculation via the skin is independent of migratory Langerhans cells. *J Virol*, 79, 1888-1897.

Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B. (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2839-2842.

Monleon E, Monzon M, Hortells P, Vargas A, Badiola JJ. (2003). Detection of PrP(sc) in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 51, 15-18.

Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, 288, 1257-1259.

- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, 14, 509-517.
- Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardiere C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol*, 82, 2017-2024.
- M'Fadyean JM. (1918). Scrapie. *J Comp Pathol*, 31, 102-131.
- Nichols TA, Spraker TR, Rigg TD, Meyerett-Reid C, Hoover C, Michel B, Bian J, Hoover E, Gidlewski T, Balachandran A, O'Rourke K, Telling GC, Bowen R, Zabel MD, VerCauteren KC. (2013). Intranasal inoculation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with lyophilized chronic wasting disease prion particulate complexed to montmorillonite clay. *PLoS One*, 8, e62455.
- Nilsson MR. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34, 151-160.
- Nonno R, Esposito E, Vaccari G, Conte M, Marcon S, Di Bari M, Ligios C, Di Guardo G, Agrimi U. (2003). Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J Clin Microbiol*, 41, 4127-4133.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-746.
- OIE. (2016). Bovine Spongiform Encephalopathy. Terrestrial Manual.
- O'Rourke KI, Besser TE, Miller MW, Cline TF, Spraker TR, Jenny AL, Wild MA, Zebarth GL, Williams ES. (1999). PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 80, 2765-2769.
- O'Rourke KI, Spraker TR, Hamburg LK, Besser TE, Brayton KA, Knowles DP. (2004). Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol*, 85, 1339-1346.
- Padilla D, Béringue V, Espinosa JC, Andreoletti O, Jaumain E, Reine F, Herzog L, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Laude H, Torres JM. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in Human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*, 7, e1001319.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10962-10966.
- Papasavva-Stylianou P, Windl O, Saunders G, Mavrikiou P, Toumazos P, Kakoyiannis C. (2011). PrP gene polymorphisms in Cyprus goats and their association with resistance or susceptibility to natural scrapie. *Vet J*, 187, 245-250.

- Pattison IH, Gordon WS, Millson GC. (1959). Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol*, 69, 300-312.
- Pattison IH, Millson GC. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol*, 71, 101-109.
- Pattison IH, Millson GC. (1960). Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol*, 70, 182-193.
- Peletto S, Bertolini S, Maniaci MG, Colussi S, Modesto P, Biolatti C, Bertuzzi S, Caramelli M, Maurella C, Acutis PL. (2012). Association of an indel polymorphism in the 3'UTR of the caprine SPRN gene with scrapie positivity in the central nervous system. *J Gen Virol*, 93, 1620-1623.
- Perucchini M, Griffin K, Miller MW, Goldmann W. (2008). PrP genotypes of free-ranging wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 89, 1324-1328.
- Pitarch JL. (2016). Aportaciones al estudio de la patogenia y aspectos genéticos de las encefalopatías espongiiformes transmisibles en rumiantes. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.
- Premzl M, Gamulin V. (2007). Comparative genomic analysis of prion genes. *BMC Genomics*, 8, 1.
- Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, Gready JE. (2003). Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene*, 314, 89-102.
- Prinz M, Huber G, Macpherson AJ, Heppner FL, Glatzel M, Eugster HP, Wagner N, Aguzzi A. (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, 162, 1103-1111.
- Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A. (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 919-924.
- Priola SA. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother*, 53, 27-33.
- Prusiner SB. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 13363-13383
- Prusiner SB. (1990). Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals. *Biologicals*, 18, 247-262.
- Prusiner SB. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner SB, Gajdusek C, Alpers MP. (1982). Kuru with incubation periods exceeding two decades. *Ann Neurol*, 12, 1-9.

Real Decreto 3454/2000 de 22 de diciembre por el que se establece y regula el Programa Integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles.

Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Real Decreto 338/2014, de 9 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1911/2000, de 24 de noviembre, por el que se regula la destrucción de los materiales especificados de riesgo en relación con las encefalopatías espongiformes transmisibles.

Reglamento CE N° 103/2009 de la Comisión de 3 de febrero de 2009 que modifica los anexos VII y IX del Reglamento (CE) no 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.

Reglamento CE N° 36/2005 de la Comisión de 12 de enero de 2005 por el que se modifican los anexos III y X del Reglamento (CE) no 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a la vigilancia epidemiológica de las encefalopatías espongiformes transmisibles en animales bovinos, ovinos y caprinos.

Reglamento CE N°260/2003 de 12 de febrero de 2003 por el que se modifica el Reglamento CE N°999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a la erradicación de las encefalopatías espongiformes transmisibles en animales ovinos y caprinos, así como a las normas para el comercio de animales vivos de las especies ovina y caprina, y de 3 embriones de bovinos.

Reglamento CE N°999/2001 de 22 de Mayo de 2001 por el se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.

Ryder SJ, Dexter GE, Heasman L, Warner R, Moore SJ. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res*, 5, 9.

Saeki K, Matsumoto Y, Matsumoto Y, Onodera T. (1996). Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 219, 47-52.

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, 4, 1157-1165.

Safar JG, Lessard P, Tamguney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F, Dearmond SJ, Prusiner SB. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis*, 198, 81-89.

Salazar E, Monleon E, Bolea R, Acin C, Perez M, Alvarez N, Leginagoikoa I, Juste R, Minguñon E, Reina R, Glaria I, Berriatua E, de Andres D, Badiola JJ, Amorena B, Lujan L. (2010). Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res*, 41, 58.

Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Ziegler U, Distl O, Leeb T. (2004). Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics*, 5, 19-25.

Sander P, Hamann H, Drögemüller C, Kashkevich K, Schiebel K, Leeb T. (2005). Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J Biol Chem*, 280, 37408-14.

Scheibel T, Lindquist SL. (2001). The role of conformational flexibility in prion propagation and maintenance for Sup35p. *Nat Struct Biol*, 8, 958-962.

Serrano C, Hammouchi M, Benomar A, Lyahyai J, Ranera B, Acin C, el Hamidi M, Monzon M, Badiola JJ, Tligui N, Zaragoza P, Martin-Burriel I. (2009). PRNP haplotype distribution in Moroccan goats. *Anim Genet*, 40, 565-568.

Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL. (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, 289, 1317-1321.

Sigurdson CJ, Manco G, Schwarz P, Liberski P, Hoover EA, Hornemann S, Polymenidou M, Miller MW, Glatzel M, Aguzzi A. (2006). Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol*, 80, 12303-12311.

Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Manco G, Polymenidou M, Schwarz P, Leclerc M, Hammarstrom P, Wuthrich K, Aguzzi A. (2007). Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers. *Nat Methods*, 4, 1023-1030.

Sigurdson CJ, Williams ES, Miller MW, Spraker TR, O'Rourke KI, Hoover EA. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, 80, 2757-2764.

Simoncic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Cecilian F, Ronchi S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett*, 469, 33-38.

Siso S, Gonzalez L, Houston F, Hunter N, Martin S, Jeffrey M. (2006). The neuropathologic phenotype of experimental ovine BSE is maintained after blood transfusion. *Blood*, 108, 745-748.

Siso S, Jeffrey M, Gonzalez L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 35, 232-246.

Somerville RA, Chong A, Mulqueen OU, Birkett CR, Wood SC, Hope J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, 386, 564.

Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 7358-7362.

Spiropoulos J, Lockey R, Sallis RE, Terry LA, Thorne L, Holder TM, Beck KE, Simmons MM. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerg Infect Dis*, 17, 2253-2261.

Spraker TR, Miller MW, Williams ES, Getzy DM, Adrian WJ, Schoonveld GG, Spowart RA, O'Rourke KI, Miller JM, Merz PA. (1997). Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in northcentral Colorado. *J Wildl Dis*, 33, 1-6.

St Rose SG, Hunter N, Matthews L, Foster JD, Chase-Topping ME, Kruuk LE, Shaw DJ, Rhind SM, Will RG, Woolhouse ME. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*, 6, 5.

Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J. (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol*, 104, 279-286.

Stack M, Gonzalez L, Jeffrey M, Martin S, Macalldowie C, Chaplin M, Thorne J, Sayers R, Davis L, Bramwell J, Grimmer S, Bellworthy S. (2009). Three serial passages of bovine spongiform encephalopathy in sheep do not significantly affect discriminatory test results. *J Gen Virol*, 90, 764-768.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 51, 229-240.

Stewart P, Shen C, Zhao D, Goldmann W. (2009). Genetic analysis of the SPRN gene in ruminants reveals polymorphisms in the alanine-rich segment of shadoo protein. *J Gen Virol*, 90, 2575-2580.

Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett*, 508, 170-174.

Tamguney G, Miller MW, Wolfe LL, Sirochman TM, Glidden DV, Palmer C, Lemus A, DeArmond SJ, Prusiner SB. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature*, 461, 529-532.

Thuring CM, Erkens JH, Jacobs JG, Bossers A, Van Keulen LJ, Garssen GJ, Van Zijderveld FG, Ryder SJ, Groschup MH, Sweeney T and Langeveld JP. (2004). Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol*, 42, 972-980.

Vaccari G, Di Bari MA, Morelli L, Nonno R, Chiappini B, Antonucci G, Marcon S, Esposito E, Fazzi P, Palazzini N, Troiano P, Petrella A, Di Guardo G, Agrimi U. (2006). Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol*, 87, 1395-1402.

Vaccari G, Panagiotidis CH, Acin C, Peletto S, Barillet F, Acutis P, Bossers A, Langeveld J, van Keulen L, Sklaviadis T, Badiola JJ, Andreeoletti O, Groschup MH, Agrimi U, Foster J, Goldmann W. (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res*, 40, 48.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, & Langeveld JP. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, 34, 1228-1231.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*, 16, 57-71.

van Keulen LJ, Vromans ME, van Zijderveld FG. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, 110, 23-32.

Valdez RA, Rock MJ, Anderson AK, O'Rourke KI. (2003). Immunohistochemical detection and distribution of prion protein in a goat with natural scrapie. *J Vet Diagn Invest*, 15, 157-162.

Vargas F, Lujan L, Bolea R, Monleon E, Martin-Burriel I, Fernandez A, De Blas I, Badiola JJ. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, 20, 187-193.

Vascellari M, Nonno R, Mutinelli F, Bigolaro M, Di Bari MA, Melchiotti E, Marcon S, D'Agostino C, Vaccari G, Conte M, De Grossi L, Rosone F, Giordani F, Agrimi U. (2007). PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*, 81, 4872-4876.

Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, Welch J, Stone L, Lloyd SE, Hill AF, Brandner S, Collinge J. (2004). Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science*, 306, 1793-1796.

Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. (1999). Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol*, 1, 55-59.

Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D. (2007). The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J*, 26, 4038-4050.

Watts JC, Westaway D. (2007). The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 654-672.

Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M Bradley R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121, 419-420.

- Wells GA, McGill IS. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, 53, 1-10.
- Wells GA, Wilesmith JW. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*, 5, 91-103.
- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB. (1994). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 6418-6422.
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 629-644.
- Wik L, Mikko S, Klingeborn M, Steen M, Simonsson M, Linne T. (2012). Polymorphisms and variants in the prion protein sequence of European moose (*Alces alces*), reindeer (*Rangifer tarandus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and fallow deer (*Dama dama*) in Scandinavia. *Prion*, 6, 256-260.
- Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec*, 128, 199-203.
- Wilesmith JW, Ryan JB, Hueston WD, Hoinville LJ. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. *Vet Rec*, 130, 90-94.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347, 921-925.
- Williams ES. (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol*, 42, 530-549.
- Williams ES, Young S. (1982). Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis*, 18, 465-471.
- Williams ES, Young S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16, 89-98.
- Wilson DR, Anderson RD, Smith W. (1950). Studies in scrapie. *J Comp Pathol*, 60, 267-282.
- White SN, Reynolds JO, Waldron DF, Schneider DA, O'Rourke KI. (2012). Extended scrapie incubation time in goats singly heterozygous for PRNP S146 or K222. *Gene*, 501, 49-51.
- Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, 289, 1163-1178.
- Wood JL, McGill IS, Done SH, Bradley R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140, 167-174.

Wrathall AE, Brown KF, Sayers AR, Wells GA, Simmons MM, Farrelly SS, Bellerby P, Squirrel J, Spencer YI, Wells M, Stack MJ, Bastiman B, Pullar D, Scatcherd J, Heasman L, Parker J, Hannam DA, Helliwell DW, Chree A, Fraser H. (2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec*, 150, 365-378.

Zhao H, Du Y, Chen S, Qing L, Wang X, Huang J, Wu D, Zhang Y. (2015). The prion protein gene polymorphisms associated with bovine spongiform encephalopathy susceptibility differ significantly between cattle and buffalo. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 531–538.

Zhang L, Li N, Fan B, Fang M, Xu W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet*, 35, 457-461.

Zou WQ, Capellari S, Parchi P, Sy MS, Gambetti P, Chen SG. (2003). Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem*, 278, 40429-40436.